

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Alanine scanning sur un mimotope de la chaîne O du lipopolysaccharide de *Brucella abortus*

Gomez Moran, Agustina

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ALANINE SCANNING SUR UN MIMOTOPE DE LA CHAÎNE O DU
LIPOPOLYSACCHARIDE DE *BRUCELLA ABORTUS***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Agustina GOMEZ MORAN
Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Alanine Scanning sur un mimotope de la chaîne O du lipopolysaccharide de *Brucella abortus*

GOMEZ MORAN Agustina

Résumé

L'anticorps monoclonal 2C8 reconnaît un épitope spécifique du lipopolysaccharide de *Brucella abortus*. Des mimes peptidiques (mimotopes) de cet épitope ont été sélectionnés. Parmi eux, quatre mimotopes, appelés 2C8(11), 2C8(12), 2C8(13) et 2C8(3) présentent des résidus consensus, c'est-à-dire des résidus de même nature, toujours situés à la même position dans le peptide. Le but de ce mémoire est de faire de la mutagenèse dirigée par alanine scanning sur un de ces quatre mimotopes pour définir la contribution de chaque acide aminé du peptide pour la reconnaissance par l'anticorps monoclonal 2C8, ainsi que le rôle du consensus dans cette interaction. Les résultats obtenus suggèrent que seuls les résidus du consensus ont un rôle essentiel pour la reconnaissance par l'anticorps monoclonal. Cette analyse permet d'envisager des stratégies d'amélioration de ces mimes peptidiques, notamment par la construction et criblage de banques de seconde génération, pour arriver à une meilleure affinité et donc peut être à une meilleure immunogénicité des mimes peptidiques.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: J.-J. Letesson

Je remercie le professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir permis de faire ce mémoire dans son laboratoire.

Je remercie le professeur Xavier De Bolle pour m'avoir orienté dans le choix du mémoire et pour avoir accepté d'être mon promoteur, lorsque j'ai commencé mon séjour en Belgique.

Merci à Thierry Laurent, mon maître Garçon. Tu m'as appris tous les mystères sur ce mémoire et tu m'as donné beaucoup de courage. Je te dois beaucoup.

Je remercie le programme Erasmus, qui m'a donné l'opportunité de vivre cette expérience enrichissante et inoubliable.

Je remercie I. Bar, N. De Schrevel, P. Renard, et N. Zammattéo pour leur lecture critique de ce mémoire.

Merci à Pascal Mertens pour les explications qu'il m'a offertes quand j'ai débuté au labo.

Céline, Nath, Nadia, Marie, un grand merci pour m'avoir encouragé. Votre présence a été pour moi une source précieuse d'aide, de conseil, et d'encouragement.

Je remercie Mauro, Jérôme, Valérie, Lionel, Sophie, Stéphanie et tous les membres du labo pour le coup de main ou les explications qu'ils m'ont données quand j'en avais besoin.

Un grand merci à ma mère et mes sœurs pour leur soutien émotionnel, et aussi à mon père pour ses sages conseils.

Merci aussi à mes responsables Erasmus Babs et Valérie, des guides et des amies au cours de mon séjour et mes études à Namur.

Agustina.

ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
AcM	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
APS	Persulfate d'ammonium
Ap /purif	Après purification
Av /purif	Avant purification
b	base
BSA	Albumine de sérum bovin
CDR	Régions déterminantes de complémentarité
CFU	Colony Forming Unit
dNTP	Désoxyribonucléotide tri-phosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthyldinitrotétracétique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Enz	Enzyme
gp8 ou gPVIII	Gène 8
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactosidase
KDa	KiloDalton
LPS	Lipopolysaccharide
MHCII	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
Maxiprep	Maxipréparation d'ADN plasmidique
ori	Origine de réplication
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
PFU	Plaque Forming Unity
pLac	Promoteur <i>lac</i>
rpm	Tour par minute
pVIII ou pIII	Protéine de capsid VIII ou III
SDS-PAGE	Dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide gel electrophoresis
SF	Small fragments
Spin	Centrifugation
TAE	Tris acétate EDTA
TBS	Tris buffer saline
TEMED	N,N,N',N' tetramethyl etylendiamin
Th	Type de réponse immunitaire (Th 1 ou Th 2)
3D	Trois dimensions

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 4

1. STRUCTURE DU LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) DE <i>BRUCELLA</i>	4
2. ANTIGÉNICITÉ ET IMMUNOGÉNICITÉ DU LPS.....	5
2.1. <i>Epitope de la chaîne O</i>	5
2.2. <i>Diagnostic</i>	7
2.3. <i>Vaccination avec du LPS</i>	8
3. MIMOTOPES, MIMES DE L'ÉPITOPE.....	9
3.1. <i>Les mimotopes et ses avantages</i>	9
3.2. <i>Problématique des mimotopes</i>	10
3.2.1. <i>Immunogénicité</i>	10
3.2.2. <i>Le mimétisme antigénique</i>	10
4. LES MIMOTOPES DE LA CHAÎNE O DU LPS DE <i>BRUCELLA</i>	12
4.1. <i>Le phage display et les mimotopes</i>	12
4.2. <i>Mimotopes du LPS de Brucella</i>	13
4.2.1. <i>Banques utilisées</i>	13
4.2.2. <i>Anticorps utilisés et mimotopes sélectionnés</i>	14
4.2.3. <i>Présence de consensus peptidique et analyse de l'interaction mimotope/anticorps par mutagenèse du peptide</i>	15

OBJECTIF DU TRAVAIL ET DONNEES PRELIMINAIRES.....16

RESULTATS18

1. UTILISATION DU PHAGEMIDE PC89 COMME VECTEUR D'EXPRESSION DU PEPTIDE 2C8(11).....	18
1.1. <i>Construction du phagemide pC89 exprimant le peptide 2C8 (11)</i>	19
1.1.1. <i>Préparation de la matrice</i>	19
1.1.2. <i>Préparation de l'insert</i>	19
1.1.3. <i>Ligation et Transformation</i>	20
1.1.4. <i>Séquençage</i>	20
1.2. <i>Test de comparaison de 2C8 (11) f88-4 avec 2C8 (11) pC89</i>	21
1.2.1. <i>Production de phages pour les systèmes d'expression phagemide et phage</i>	21
1.2.2. <i>Evaluation du nombre de PVIII par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)</i>	22
1.2.3. <i>Test de l'affinité de l'AcM 2C8 pour les phages F88-4/2C8(11) et pC89/2C8(11) en ELISA</i>	22
2. ALANINE SCANNING DU MIMOTOPE 2C8(11) EXPRIMÉ DANS LE PC89.....	23

2.1.	<i>Construction des phagemides pC89 exprimant les peptides 2C8(11) mutés par Alanine Scanning</i>	24
2.1.1.	Préparation de la matrice	25
2.1.2.	Préparation des inserts	25
2.1.3.	Ligation et Transformation	26
2.1.4.	Séquençage.....	26
2.2.	<i>Test des mutants alanine</i>	27
2.2.1.	Préparation de surnageant de phage	27
2.2.2.	Expérience de Dot Blot.....	28
3.	ANALYSE DE CONSENSUS ÉTENDU ET STRICT	29
3.1.	<i>Construction des phagemides pC89 exprimant le consensus étendu ou strict du mimotopes 2C8 (11)</i>	30
3.1.1.	Préparation de la matrice	30
3.1.2.	Préparation de l'insert	30
3.1.3.	Ligation, Transformation et séquençage	31
3.2.	<i>Test des consensus strict et étendu par rapport à 2C8 (11) pC89</i>	31
3.2.1.	Production de surnageant de phage	31
3.2.2.	Expérience de Dot Blot.....	31

DISCUSSION , CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....33

MATERIEL ET MÉTHODES36

1.	TECHNIQUE D'OBTENTION ET D'AMPLIFICATION D'ADN DOUBLE BRIN	36
1.1.	<i>Réaction de polymérisation d'ADN en chaîne (PCR)</i>	36
1.1.1.	Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions pC89/2C8 (11), pC89/consensusétendu et pC89/consensus strict.....	36
1.1.2.	Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions de l'Alanine Scanning de T(1) à M(7)	37
1.1.3.	Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions de l'Alanine Scanning de I (8) à Y (14)	38
1.1.4.	PCR sur colonies d'Escherichia coli DH11S contenant les constructions des phagemides pC89	39
2.	TECHNIQUES D'ANALYSES D'ADN	40
2.1.	<i>Electrophorèse</i>	40
2.2.	<i>Spectrophotométrie</i>	43
2.3.	<i>Séquençage d'ADN</i>	43
3.	TECHNIQUE DE PURIFICATION DE L'ADN	44
3.1.	<i>Extraction au phénol</i>	44
3.1.1.	Purification des produits de PCR des inserts utilisés pour les constructions dans PC89	44
3.2.	<i>Purification des produits PCR utilisés des constructions dans pC89 et des PCR sur colonies</i>	45
3.3.	<i>Extraction de l'ADN à partir de gel</i>	46
4.	TECHNIQUES DIVERSES RELATIVES À L'ADN	47

4.1.	<i>Restriction</i>	47
4.1.1.	<i>Restriction de pC89</i>	47
4.1.2.	<i>Restriction des différents produits PCR purifiés</i>	48
4.2.	<i>Ligation</i>	50
4.2.1.	<i>Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés 2C8 (11), consensus étendu et consensus strict</i>	50
4.2.2.	<i>Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés des mutants Alanine T¹, Q², N³, E⁴, S⁵, C⁶, M⁷</i>	51
4.2.3.	<i>Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés des mutants Alanine I⁸, V¹³</i>	51
4.2.4.	<i>Ligation de la matrice pC89 et fragments de PCR restreints et purifiés pour chacune des séquences codant les mutants pour Alanine W⁹, C¹⁰, D¹¹, T¹², Y¹⁴</i>	52
5.	<i>TECHNIQUE DE PREPARATION DE L'ADN</i>	52
5.1.	<i>Maxipreparation d'ADN plasmidique</i>	52
6.	<i>PREPARATION DE PHAGES</i>	54
6.1.	<i>Preparation des phages pC89/2C8 (11) (Système phagemide)</i>	54
6.2.	<i>Preparation de phages F88-4 exprimant 2C8 (11) à partir de cellules K91KAN (Système phage)</i>	55
6.3.	<i>Determination du nombre de Colony Forming Units (PFU) pour les preparations de phages F88-4/2C8 (11) et pC89/2C8 (11)</i>	56
7.	<i>TECHNIQUES BASÉS SUR LA RECONNAISSANCE ANTIGÈNE-ANTICORPS</i>	57
7.1.	<i>Enzyme Linked Immuno Essay Absorbed (ELISA) : Etude de la reconnaissance entre le peptide 2C8 (11) présenté sur différents types de phages et l'AcM 2C8</i>	57
7.2.	<i>Dot Blot</i>	58
8.	<i>TECHNIQUE DE TRANSFORMATION DE BACTÉRIES</i>	59
8.1.	<i>Informations générales</i>	59
8.2.	<i>Préparation de cellules competentes DH11S</i>	59
8.3.	<i>Transformation des cellules DH11S "CaCl₂ competentes" avec les produits de ligation de nos différentes constructions</i>	60
8.3.1.	<i>Constructions pC89/2C8 (11), pC89/CONSENSUS ETENDU et pC89/CONSENSUS STRICT</i>	60
8.3.2.	<i>Construction des mutants de l'alanine scanning T¹ à V¹⁴</i>	61
8.4.	<i>Transformation de la souche XL1 BLUE "CaCl₂ competentes" par le phagemide pC89</i>	61
9.	<i>DIVERS</i>	61
9.1.	<i>Antibiotiques</i>	61
9.2.	<i>Autres</i>	62

BIBLIOGRAPHIE63

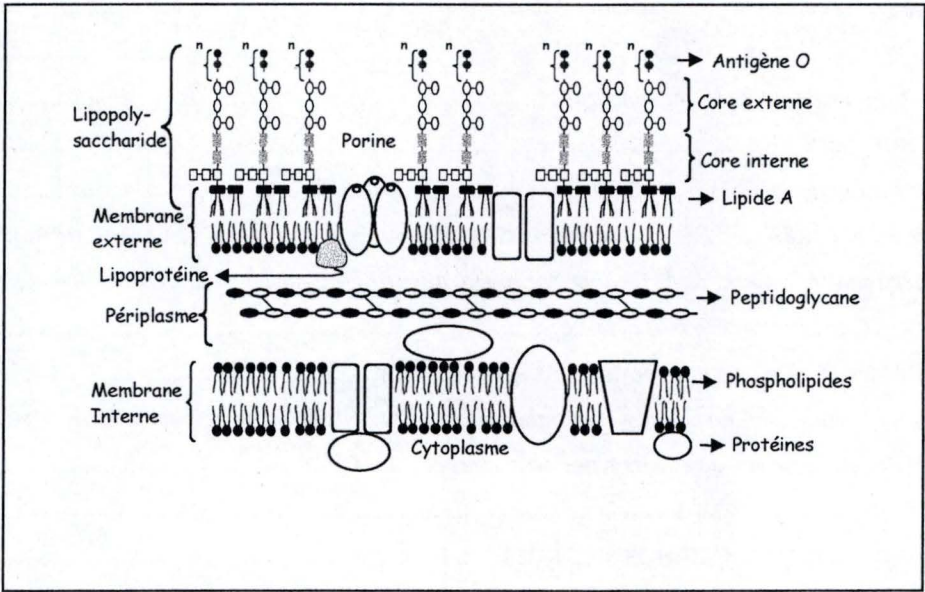


Figure 1. Représentation schématique de la membrane externe des bactéries Gram-négatives (Thèse de Godefroid, F., 1999).

INTRODUCTION

1. Structure du lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*.

Brucella est une bactérie pathogène intracellulaire facultative faisant partie de la famille des $\alpha 2$ protéobactériacées (Moreno *et al.*, 1990). Comme toutes les bactéries Gram négatives, elle possède du lipopolysaccharide (LPS) inséré dans le feuillet externe de sa membrane externe. On distingue dans les bactéries Gram négatives celles qui possèdent du LPS avec une chaîne O (Smooth ou lisse) et celles qui n'en possèdent pas (Rough ou rugueuse). Dans le genre *Brucella*, des souches des deux types ont été identifiées. Les souches possédant une chaîne O sont habituellement plus virulentes que les souches rugueuses (Godfroid *et al.*, 1998) (White *et al.*, 1951) et si on enlève la chaîne O d'une souche lisse, elle devient avirulente dans certains modèles (exemple dans les macrophages de souris).

La structure générale du LPS de *Brucella* est identique à celui de la plupart des autres bactéries Gram négatives, (Figure 1) mais il possède une composition spécifique qui varie même entre les différentes souches de *Brucella* :

- Le lipide A (la fraction du LPS insérée dans la membrane externe) du LPS de *Brucella* se caractérise par la présence de disaccharides 2,3 amino didéoxy-D-glucose avec des liaisons β -1,6 (Qureshi *et al.*, 1994). Dans le cas de *Brucella abortus* ces disaccharides sont souvent décotés par des groupements phosphate.

- Le mannose, le 2-amino-2,6-didéoxy-D-glucose (Freer *et al.*, 1995) et le 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate (Moriyon & Lopez-Goni, 1998) ont été identifiés comme des composants du core de *Brucella* mais on connaît peu de choses sur sa structure ou sa nature exacte.

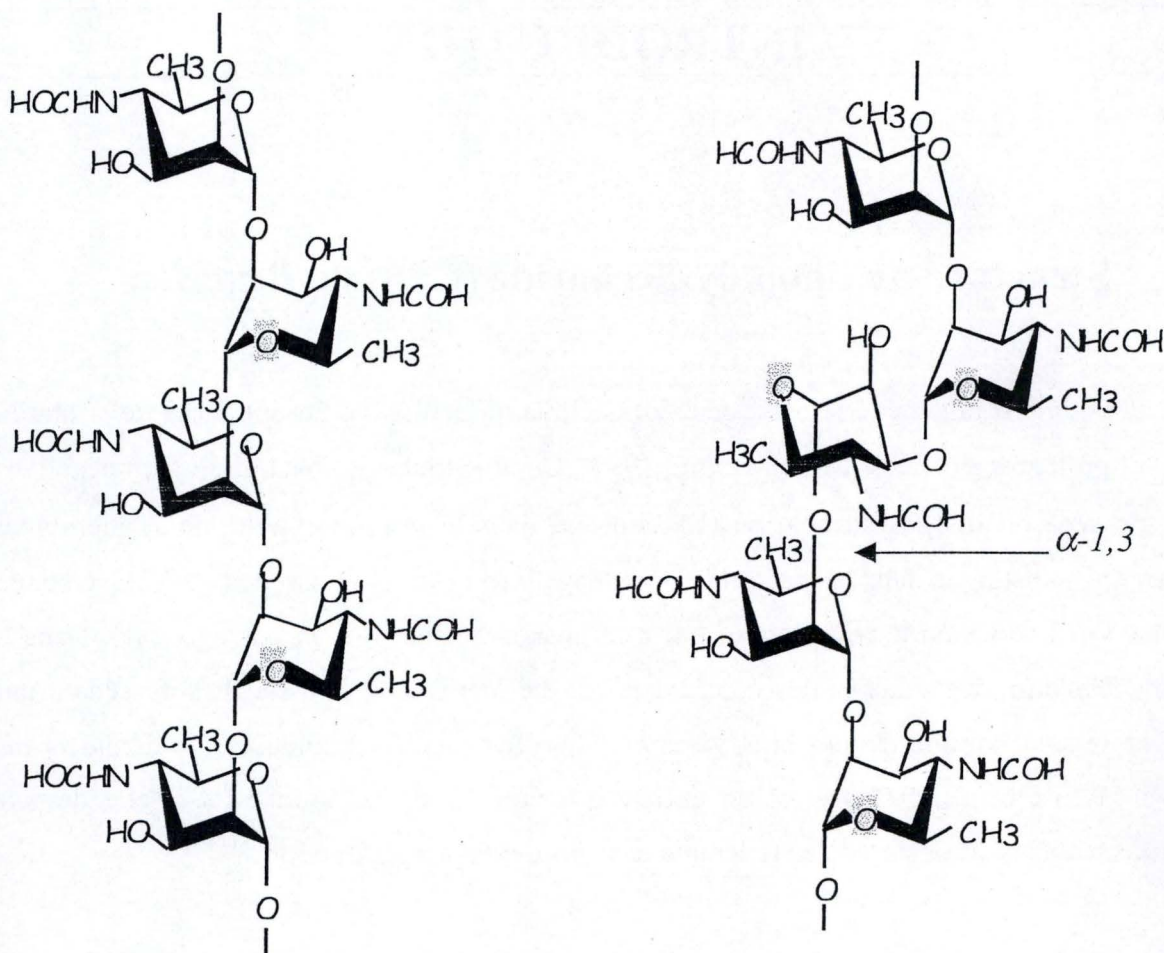


Figure 2- Représentation schématique d'un fragment de la chaîne O de *Brucella*.

A gauche, une chaîne O où les monomères sont reliés exclusivement avec des liaisons α-1,2.
 A droite, une chaîne O dont la liaison entre les monomères 2 et 3 se fait en α-1,3 (Bundle *et al*, 1989).

- La chaîne O (fragment du LPS le plus éloigné de la membrane, qui est en contact direct avec l'environnement extérieur) est la partie qui va nous intéresser le plus dans la suite. La chaîne O du LPS de *Brucella* est formée d'un homopolymère de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannose (N-formyl-perosamine) (Bundle *et al.*, 1987) (Caroff *et al.*, 1984). La taille de la chaîne O et le type de liaison entre les monomères de N-formyl-perosamine peuvent varier entre les différentes souches de *Brucella* (Bowden *et al.*, 1995) (Figure2).

Chez *Brucella melitensis* biotype 1, il a été proposé que la chaîne O est formée d'une répétition de cinq résidus N-formyl-perosamine dont quatre sont reliés par des liaisons α -1,2 et un par une liaison α -1,3 (Bundle *et al.*, 1987). Les souches de *Brucella* possédant ce type d'agencement de N-formyl-perosamine sont dites du type M ou "M-dominante" (Bundle, *et al.*, 1987) (Meikle *et al.*, 1989). Concrètement, pour *Brucella melitensis* 16 M a été reporté environ un 20 % de liaisons α -1,3 (Bundle *et al.*, 1989).

Chez *Brucella abortus* biotype 1, la chaîne O est formée d'un homopolymère dont les monomères de N-formyl-perosamine sont liés principalement par des liaisons α 1,2 (seulement 2 % de liaison α -1,3 reporté pour *Brucella abortus* 1119-3 (Bundle, *et al.*, 1989)) (Bundle, *et al.*, 1987) (Meikle, *et al.*, 1989).

Il a été observé que ce type de chaîne O présente une structure en hélice de type "Rod-like". Ces *Brucella* sont dites A dominantes (Rose *et al.*, 1993).

2. Antigénicité et immunogénicité du LPS

2.1. Epitope de la chaîne O

Il a été observé chez la plupart des mammifères infectés par des *Brucella*, que la majorité des anticorps produits contre l'agent infectieux sont dirigés contre son LPS (Fernandez-Lago & Diaz, 1986) (Oomen *et al.*, 1991) et sa chaîne O (Betts *et al.*, 1993) (Cloeckaert *et al.*, 1993) (Weynants *et al.*, 1997) (Brandenburg & Seydel, 1998). C'est également un des composant reconnu par le système immunitaire inné (Ulevitch & Tobias, 1999).

Quatre types d'épitopes¹ ont été définis sur la chaîne O du LPS à l'aide d'anticorps spécifiques (Cloekaert *et al.*, 1993) (Weynants *et al.*, 1997).

Il existe des anticorps monoclonaux qui ne reconnaissent que la chaîne O des *Brucella* de type A (ou A dominant). On peut donc admettre qu'il existe au moins un épitope présent uniquement sur ce type de chaîne O. La structure de cet épitope, appelé A, n'est pas connu, mais il a été démontré que la structure minimale reconnue par un anticorps monoclonal anti-A (YST9.1 est de 5 résidus de N-formyl-perosamine liés en α -1,2 (Bundle, *et al.*, 1989). De même, l'épitope M a été défini comme étant celui reconnu par des anticorps monoclonaux ne reconnaissant que la chaîne O des *Brucella* de type M. Sa composition serait de 4 résidus de N-formyl-perosamine dont le troisième et le quatrième seraient liés en α -1,3 (Bundle, *et al.*, 1989) (Bundle, *et al.*, 1987). De nouveau, sa structure tridimensionnelle n'a pas été identifiée.

Finalement, des anticorps monoclonaux reconnaissant les *Brucella* de type A et M, et d'autres reconnaissant les deux types de *Brucella* mais aussi *Yersinia enterocolitica* O:9 (bactérie Gram négative possédant une chaîne O formée d'un homopolymère de N-formyl-perosamine liés exclusivement entre eux par des liaisons α 1-2) ont donné naissance respectivement à l'épitope C (commun) et C/Y (Commun/*Yersinia*) (Bundle, *et al.*, 1989) (Cloekaert, *et al.*, 1993) (Palmer & Douglas, 1989) (Figure 3 et figure 4).

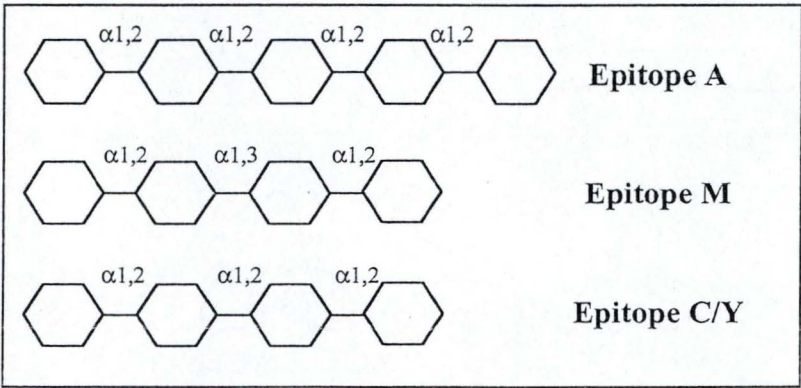
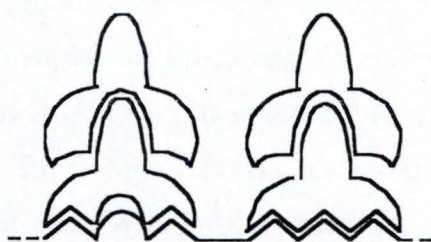


Figure 3 - Schéma de la structure proposée des épitopes A, M et C/Y de *Brucella* (Bundle, 1989).

¹ Un épitope est défini comme la structure antigénique minimale reconnue par un anticorps donné (Greenspan, 1992).

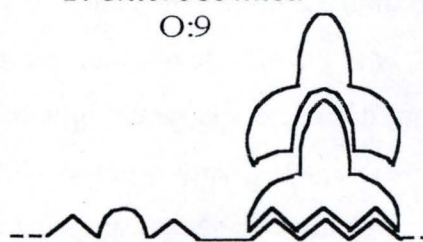
Test
diagnostiques

Sérum de bovin
infecté par
Brucella



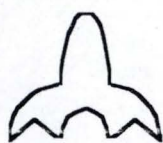
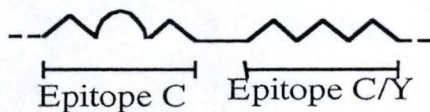
Micropuits coloré :
résultat positif

Sérum de bovin
infecté par
Y. enterocolitica
O:9

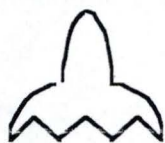


Micropuits coloré :
résultat faussement
positif

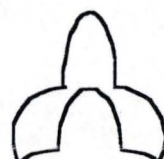
LPS lisse de *Brucella*



Ac bovin
anti-épitope C



Ac bovin
anti-épitope C/Y



Ac anti-Ac bovin
(utilisé pour la détection)

Figure 5- Réaction faussement positive dans la détection de la Brucellose chez les bovins .

Chez les animaux infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9, la présence d'épitope commun C/Y sur leur chaîne O induit des anticorps cross-réactifs contre le LPS de *Brucella*. Ces anticorps reconnaissent des épitopes présents sur le LPS de *Brucella* et les tests de détection seront faussement positifs.

Les différentes souches de *Brucella* peuvent être classifiées en serotype grâce à des tests d'agglutination avec des sérums polyclonaux mono-spécifique A ou M (Alton *et al.*, 1975) (Wilson, 1984) qui mettent en évidence la présence ou l'absence de ces différents épitopes.

	Reconnaissance de souches		
Ac monoclonaux dirigés contre la chaîne O de <i>Brucella</i>	<i>Brucella</i> Souches de type A	<i>Brucella</i> Souches de type M	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
anti-A	+	-	-
anti-M	-	+	-
anti-C	+	+	-
anti-C/Y	+	+	+

Figure 4 - Différents anticorps monoclonaux ont été isolés contre la chaîne O de *Brucella* et ils présentent des spécificités différentes : soit reconnaissance positive des souches de type A ou M ou toutes les deux et *Yersinia enterocolitica* O:9. Dans l'ensemble des anticorps avec une même spécificité on trouve des affinités variables.

2.2. Diagnostic

En médecine vétérinaire, les propriétés antigéniques du LPS de *Brucella* sont exploitées dans des tests diagnostiques dits "indirects" qui tentent de détecter la présence d'anticorps anti-LPS (Kittelberger *et al.*, 1998). Cependant, il existe dans ces tests, des problèmes de faux positifs (Weynants *et al.*, 1996) liés à l'existence d'épitopes partagés entre plusieurs espèces bactériennes (Bundle *et al.*, 1984) (Fernandez-Lago *et al.*, 1982). Un animal infecté par *Yersinia enterocolitica* O:9 produira par exemple des anticorps reconnaissant l'épitope C/Y et sera donc positif dans un test diagnostique de la brucellose (Weynants, *et al.*, 1997) (Cloeckaert, *et al.*, 1993) (Vizcaino *et al.*, 1991) (Ahvonen *et al.*, 1969) (Figure 5).

2.3. Vaccination avec du LPS

D'un point de vue immunologique, de nombreux anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne O de *Brucella* (Montaraz *et al.*, 1986) (Cloeckaert *et al.*, 1992) (Limet *et al.*, 1989) ainsi qu'un petit nombre dirigé contre le LPS rugueux sont protecteurs contre la brucellose dans un modèle murin de transfert passif (Cloeckaert *et al.*, 1993). On retrouve de plus un haut titre anti-LPS dans le serum des animaux vaccinés avec des souches atténuées B19 et Rev1. Récemment, il a été démontré que la protection contre une infection par *Brucella abortus* 544 est meilleure lorsque l'on utilise *Yersinia enterocolitica* O:9 par rapport à *Yersinia enterocolitica* O:3 comme vecteur de distribution de plasmide nu encodant deux protéine de *Brucella* (Al-Mariri *et al.*, 2002). Cette augmentation de la protection est liée à la présence d'un LPS possédant des épitopes partagés avec *Brucella abortus*. La vaccination avec des fragments oligosaccharidiques du LPS a déjà été essayée contre *Brucella* et d'autres pathogènes (Shin *et al.*, 2001) (Andreoni *et al.*, 1993) (Goldblatt *et al.*, 1992), mais actuellement il n'y a aucun vaccin basé sur des polysaccharides qui soit protecteur à long terme contre la brucellose (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2002). Une des explications au manque de protection de ces vaccins sous-unitaire est que la réponse immunitaire induite par les polysaccharides est de type T-indépendant ce qui implique l'absence de production de cellules-B mémoire, l'absence de maturation d'affinité et l'absence de réponse secondaire cellulaire (Martinez-Alonso *et al.*, 1980; Monzavi-Karbassi, *et al.*, 2002). D'un autre côté, une étude a récemment montré que la chaîne O du LPS de *Brucella abortus* pourrait s'associer à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (MHCII) de lymphocytes B humains et murins (Forestier *et al.*, 1999). Quoi qu'il en soit, l'utilisation du LPS seul, dans un vaccin sous-unitaire n'a jamais donné une protection suffisante contre la brucellose.

Pour améliorer les vaccins à base de LPS et induire une réponse immunitaire T-dépendante, on peut conjuguer les molécules de LPS à des protéines porteuses (Loughlin *et al.*, 1992) (les protéines sont théoriquement les seules molécules capables d'induire une réponse immunitaire T-dépendante). Les différents essais menés dans cette voie sont parvenus à induire une réponse immune de type Th-2 avec un haut titre d'anticorps neutralisants mais pas de réponse immunitaire cellulaire (Monzavi-Karbassi, *et al.*, 2002).

Des stratégies alternatives ont été développées pour obtenir des vaccins contre des pathogènes ou l'antigène prédominant est de nature saccharidique. L'une de ces approches passe par la recherche de peptides qui mimeraient les polysaccharides d'un point de vue de leur antigénicité. Ces types de peptides s'appellent les mimotopes (De Bolle *et al.*, 1999), (Fleuridor *et al.*, 2001) (Steward *et al.*, 1995) (Westerink *et al.*, 1995) (Charalambous & Feavers, 2000) (Shikhman *et al.*, 1994).

3. Mimotopes, mimes de l'épitope

3.1. Les mimotopes et ses avantages

Un peptide mimotope (Kohler *et al.*, 1989), par la nature de ses constituants et sa structure tridimensionnelle (Steward *et al.*, 1995), est capable d'interagir avec un anticorps donné qui lui-même reconnaît l'épitope mimé. Le rôle d'un mimotope, utilisé dans un objectif vaccinal, est d'induire une réaction croisée c'est-à-dire de provoquer la production d'anticorps protecteurs reconnaissant également tel ou tel épitope mimé (Young *et al.*, 1997) (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2002) (Charalambous and Feavers, 2000).

Plusieurs avantages à l'utilisation de mimotope plutôt que les antigènes polysaccharidiques ont été mis en évidence dans la littérature. Tout d'abord, les peptides sont plus faciles à manipuler que les polysaccharides. Ils sont plus faciles à caractériser tant d'un point de vue séquence que d'un point de vue structure que les polysaccharides (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2002). Le séquençage du peptide ou de la séquence du vecteur d'expression l'encodant est des techniques courantes et à ce jour on connaît bien plus sure la structure des protéines que sur celle des sucres. Les peptides sont aussi plus faciles à synthétiser (soit par synthèse chimique, soit par construction de vecteur d'expression bactérien, phagemidique ou autre encodant la séquence peptidique) et leur manipulation n'implique pas d'investissement dans la bio-sécurité comme c'est le cas pour l'extraction de fractions polysaccharidiques de pathogènes. En outre, les peptides sont facilement conjugables à des protéines porteuses comme la BSA (Albumine Sérique Bovine) ou la toxine tétanique ce qui permet d'augmenter et de diriger leur immunogénicité (Fleuridor *et al.*, 2001) (Arnon *et al.*, 2000).

Il a été montré que l'on pouvait notamment produire des batteries de mimotopes possédant des gammes d'affinité différentes pour l'anticorps (Luo *et al.*, 1998). Certains auteurs ont aussi cherché à réduire la taille du peptide mimotope pour trouver la partie antigénique la plus petite, ce qui est extrêmement difficile à réaliser avec un antigène polysaccharidique étant donné les difficultés rencontrées dans ce genre de chimie organique de synthèse (Valadon *et al.*, 1998). Ces améliorations pourraient considérablement améliorer la spécificité et la sensibilité des tests diagnostiques.

3.2. Problématique des mimotopes

3.2.1. Immunogénicité

Cependant, malgré leurs nombreuses qualités, les mimotopes peptidiques de polysaccharides souffrent d'une grande faiblesse : la plupart d'entre eux sont faiblement immunogènes contre l'antigène mimé et aucune protection n'a été rapportée à ce jour. De nombreuses équipes sont parvenues à isoler des mimotopes antigéniques qui possédaient une forte affinité pour l'anticorps spécifique du polysaccharide et qui de plus étaient capables d'entrer en compétition avec celui-ci. Malgré cela, très peu de cas de mimotope immunogène, c'est-à-dire ayant induit des anticorps contre le polysaccharide mimé lorsqu'ils sont utilisés en immunisation (Phalipon *et al.*, 1997) (Charalambous and Feavers, 2000) (Shin *et al.*, 2001) (Westerink *et al.*, 1995) (Measles virus (Steward *et al.*, 1995)) ont été recensés.

3.2.2. Le mimétisme antigénique

Plusieurs hypothèses sur le manque de mimétisme protecteur ont été émises. Le mimétisme antigénique est basé essentiellement sur l'interaction entre deux structures tridimensionnelles données. L'interaction entre le peptide mimotope et la structure de l'anticorps où le polysaccharide se lie, c'est généralement décrit comme un phénomène de surface (Young *et al.*, 1999), sauf dans certains cas particuliers (réponse par anti-idiotype 6F9 (Westerink *et al.*, 1990)).

Différents mimotopes sélectionnés avec le même anticorps peuvent se lier différemment dans les cavités formées par les régions déterminantes de complémentarité (CDR) de cet anticorps (Young *et al.*, 1999). Dans ce cas, les différents mimotopes pourraient par exemple représenter différentes parties chevauchantes ou non de la topographie de l'épitope polysaccharidique. Ce serait donc des mimes imparfaits car partiels et même ces mimes entrent en compétition avec l'antigène, ils sont trop partiels pour induire des anticorps le reconnaissant complètement (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2002).

Une autre hypothèse serait que la reconnaissance entre l'anticorps anti-polysaccharide et l'antigène ou le mimotope peptidique ne se ferait pas par les mêmes interactions moléculaires et que donc la nature même du peptide ne serait pas adéquate pour la production d'anticorps anti-polysaccharide (Harris *et al.*, 1997).

Finalement, d'autres auteurs avancent qu'un polysaccharide, de par sa nature et sa présentation d'antigène multivalente, active le système immunitaire de manière tout à fait différente que celle dont le fait un peptide (couplé ou non à un carrier). Utiliser le peptide pour espérer induire une réponse contre le polysaccharide serait difficile car le partenaire du système immunitaire serait trop différent (Harris *et al.*, 1997). La relation entre le mimétisme antigénique et immunogénique n'est pas dilucidée. Citons qu'il a même été démontré qu'un mimotope antigénique médiocre s'est révélé un bon mimotope immunogénique (Anti-idiotypes (Monafo *et al.*, 1987)). Il a été proposé que dans le mimétisme immunogénique il y a des autres facteurs en plus de la similarité structurale avec l'antigène carbohydrate, et qui seraient spécifiques de sous-types du carbohydrate antigène qui interviendraient dans la réponse de production d'anticorps contre l'antigène original (Harris *et al.*, 1997).

Pour bien comprendre les mécanismes de reconnaissance entre un peptide mimotope et un anticorps et déterminer les caractéristiques qu'un peptide devrait posséder pour espérer qu'il soit immunogénique contre l'antigène, il faudrait encore mener des études biophysiques et structurales sur ces couples d'interactants (Young *et al.*, 1999).

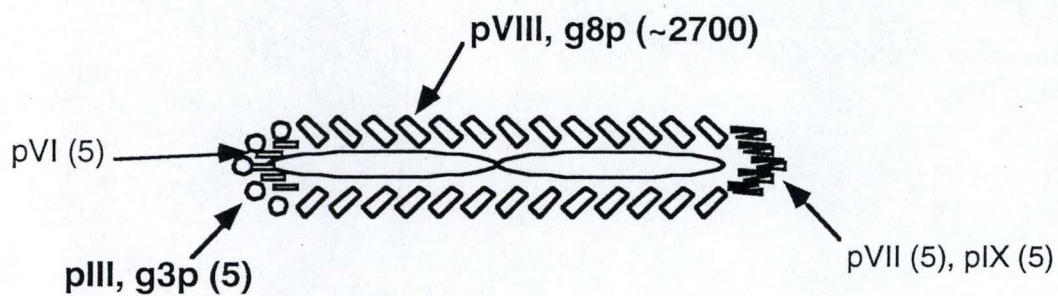


Figure 6- Protéines de capsid des phages filamenteux (M13 ou f1)

De toutes les protéines de capsid, la pVIII est la plus abondante. Les protéines pVIII et pIII sont les plus couramment utilisées dans les techniques de présentation de polypeptides à la surface de phages (Webster et Lopez, 1985).

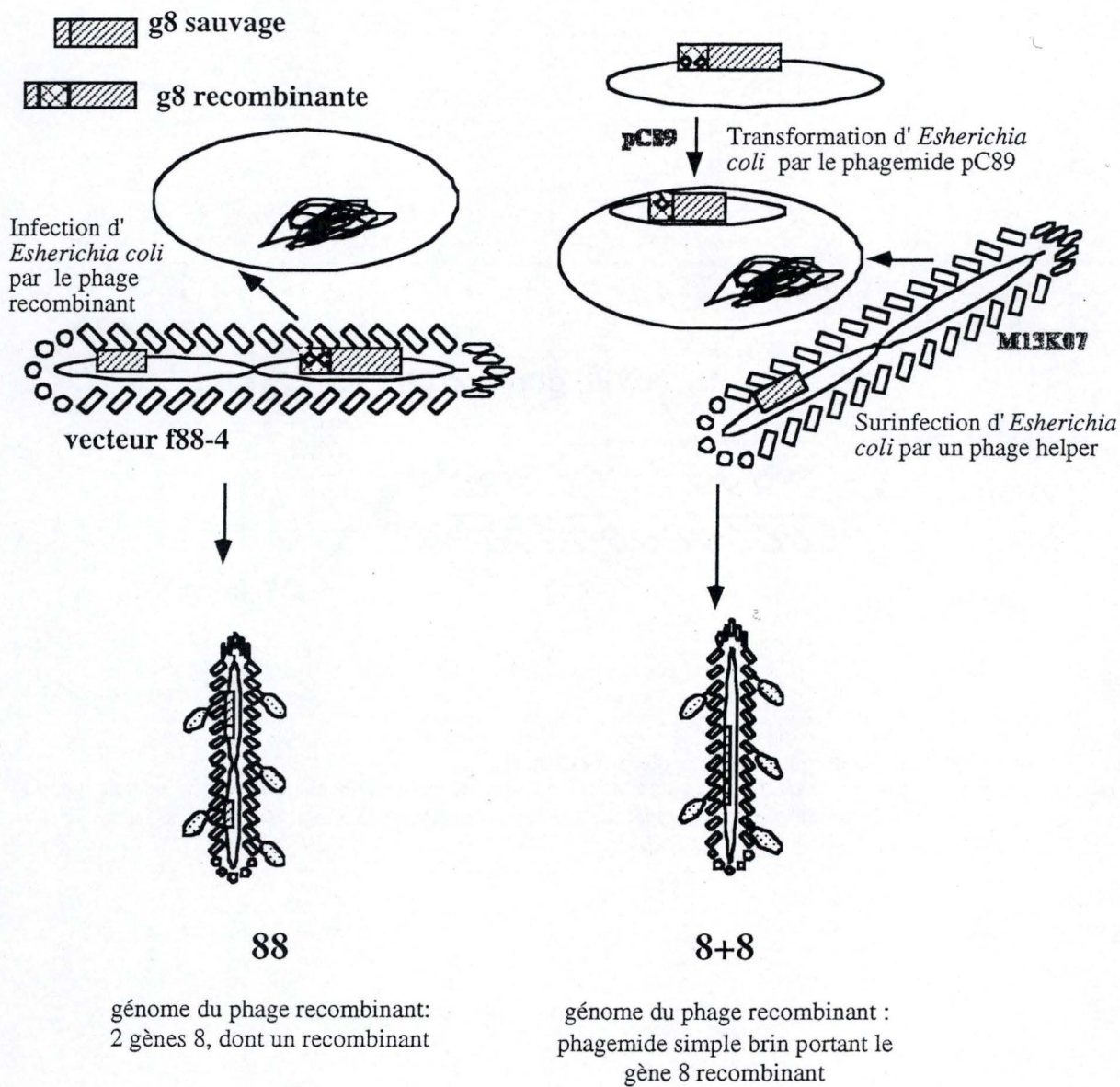


Figure 7 - Système de présentation d'un peptide mimotope fusionné à la PVIII.
Types de vecteurs utilisés pour la présentation de peptide à la surface de phage.

4. Les mimotopes de la chaîne O du LPS de *Brucella*

4.1. Le phage display et les mimotopes

L'une des méthodes les plus courantes pour obtenir des mimotopes peptidiques est de les sélectionner dans des banques de peptides aléatoires à l'aide de l'anticorps d'intérêt. Dans le cadre de la recherche de mimotope de la chaîne O du LPS de *Brucella*, différentes banques de peptides aléatoires exprimés à la surface de phages filamenteux ont été criblées avec des AcM reconnaissant différents épitopes de la chaîne O de *Brucella*.

L'expression d'une molécule à la surface de phage ou "phage display" (décrit par Smith en 1985) consiste en la fusion génétique de peptides aléatoires ou de protéines plus complexes à l'extrémité amino terminale de protéines de capsid du phage (Protéines pIII ou pVIII –Figure 6-). Par la suite nous ne détaillerons que la protéine PVIII, qui est celle qui a servi à la présentation de mimotopes de la chaîne O de *Brucella*. Pratiquement, la séquence nucléotidique aléatoire encodant les peptides est liguée au début de la séquence nucléotidique encodant de la protéine de la capsid ; la protéine recombinante résultante est ensuite exportée à la surface du phage comme le serait une protéine de capsid sauvage et elle présente le peptide à l'extrémité N-terminale qui est en contact avec l'environnement extérieur.

Notons que la présentation de peptides à la surface de phage a des applications non seulement en immunologie mais aussi en médecine, en biochimie et en biologie cellulaire (Wang *et al.*, 1995) (DeGraaf *et al.*, 1993) (Kay *et al.*, 1996). La présentation de peptide à la surface de phage a été utilisée pour trouver des peptides mimant des épitopes peptidiques linéaires ou conformationnels (Wu & Lin, 2001) mais aussi différents polysaccharides (Phalipon *et al.*, 1997) dont le LPS de *Brucella* (De Bolle *et al.*, 1999) et (Mertens *et al.*, 2001).

L'utilisation de phage comme vecteur de présentation offre plusieurs avantages : tout d'abord, la construction d'une banque de phages est relativement facile puisqu'elle ne requiert que peu d'outils de biologie moléculaire classique (clonage d'un fragment d'ADN double brin encodant une séquence aléatoire dans la séquence de la protéine de capsid). De nombreux types de banques de peptides sur phage ont été contruites (Figure 7) et leur taille varie de 10^7

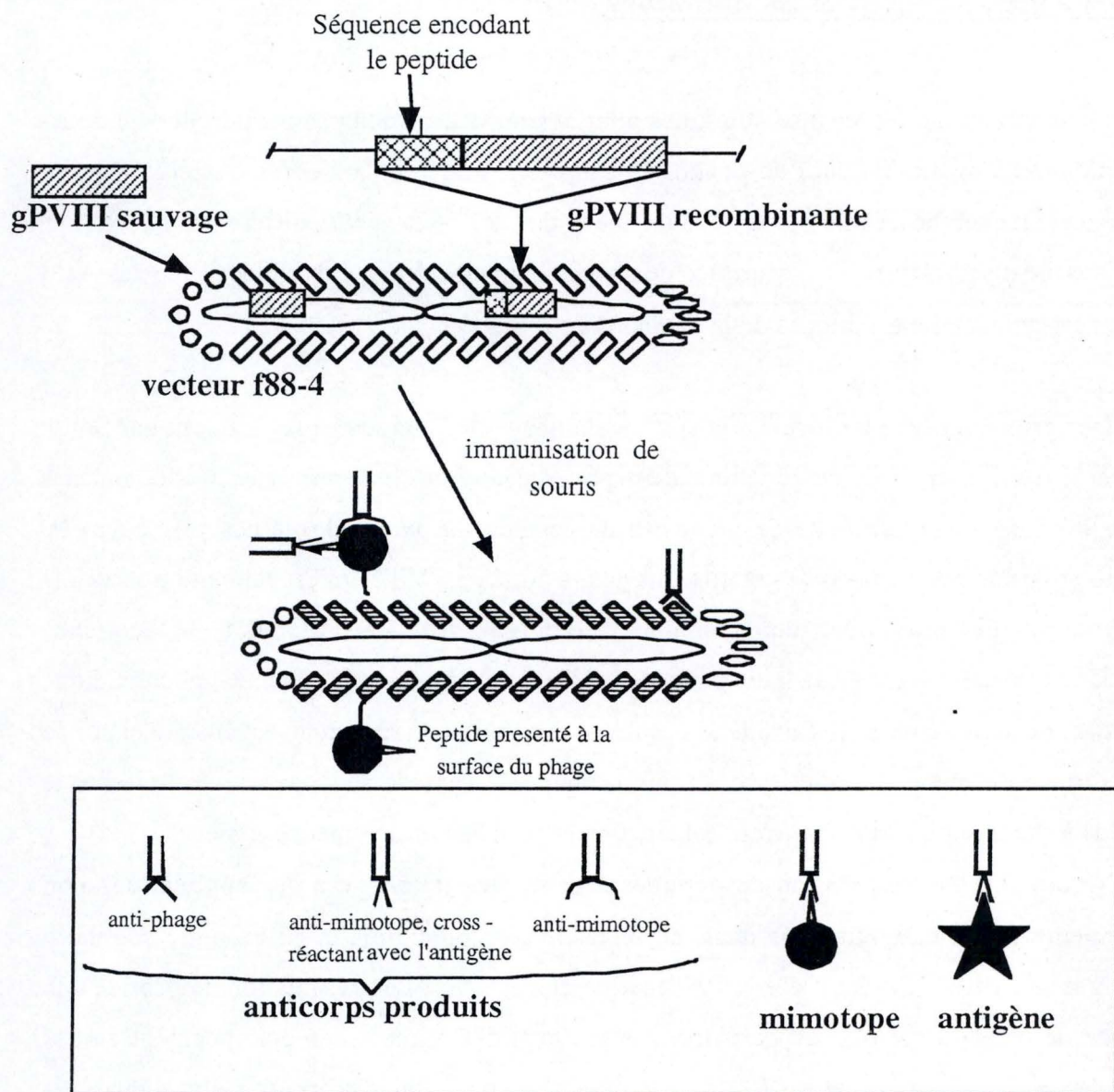


Figure 8 - Production d'anticorps contre un peptide mimotope

Les phages sont utilisés comme carriers lors de l'immunisation. Le vecteur d'expression présenté ici est le f88-4. Lors de l'immunisation, l'hôte produit des anticorps dirigés contre le carrier (phage) et contre le peptide mimotope. Certains des anticorps dirigés contre le mimotope reconnaissent également l'antigène, si le mimotope est immunogénique.

à 10^{13} clones (dans le meilleur des cas) (DeGraaf *et al.*, 1993). Les particules phagiennes créent un lien direct entre la séquence nucléotidique formant l'insert aléatoire (dans le génome du phage) et la séquence peptidique qui va s'exprimer à la surface du phage (peptide sur la capside du phage) si bien qu'un peptide sélectionné en *phage display* est très facilement séquencé. L'utilisation de la protéine de capside PVIII qui est la protéine majeure du phage (2700 exemplaires/phage) permet également une présentation multivalente du peptide (Smith, 1988) (Hoess *et al.*, 1993) ce qui a pour avantage de permettre d'utiliser non seulement l'affinité mais aussi l'avidité existant entre des anticorps et ses mimotopes. Finalement, certaines équipes ont même utilisé le phage comme carrier en immunisation (di Marzo Veronese *et al.*, 1994) (Meola *et al.*, 1995) (Yip *et al.*, 2001) (de la Cruz *et al.*, 1988) (Figure 8).

4.2. Mimotopes du LPS de Brucella

4.2.1. Banques utilisées

Deux types de banques² ont été utilisées pour isoler les mimotopes de la chaîne O de *Brucella* (Mertens *et al.*, 2001) (De Bolle *et al.*, 1999) : Les banques de Smith (type phage (Scott & Smith, 1990)) et les banques construites par l'équipe de F. Felici (type phagemide (Felici *et al.*, 1991) (Martin *et al.*, 1994) (Bianchi *et al.*, 1995) (Luzzago *et al.*, 1993)).

Le système de Smith utilise comme vecteur un phage possédant deux gènes encodant la PVIII (*gp8*). L'un de ces deux gènes est sauvage et l'autre est synthétique, pour éviter les recombinaisons avec le gène *gp8* sauvage et a été additionné de site de restriction *HindIII* et *PstI*, ce qui permet le clonage d'inserts (Smith, 1988). La nomenclature veut que l'on appelle ce type de banque f88 car il y a deux gènes encodant la PVIII dans un même génome. Son vecteur de départ s'appelle le fdtet et la banque F88-4.

² Rappelons qu'il y a des limites tant dans la taille du peptide fusionné à la PVIII que dans le nombre de peptides exprimés par phage. Des peptides de taille supérieure à 8 acides aminés déstabilisent la capside du phage s'ils sont présents sur toutes les PVIII, il est donc nécessaire de continuer à produire de la PVIII sauvage en plus de la pVIII recombinante de manière à conserver l'intégrité de la structure du phage. Des protéines entières ne sont pas présentables en fusion de la PVIII, probablement parce qu'elles déstabilisent trop la structure du phage ou inhibent son assemblage à la sortie de la cellule bactérienne.

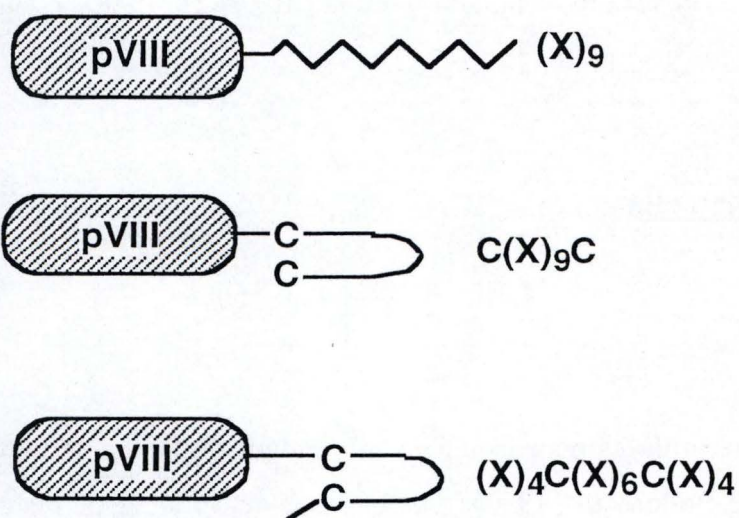


Figure 9 - Banques utilisées pour isoler des peptides mimotopes avec l'AcM2C8.

Ces trois types de banques se caractérisent par le nombre de résidus aléatoires (X) dans les peptides présentés, la présence des cystéines fixes (C) et les types de vecteur utilisés : F88-4 pour $(X)_4C(X)_6C(X)_4$ et pC89 pour $C(X)_9C$ et $(X)_9$

Dans le système qu'a construit l'équipe de F. Felici la PVIII recombinante n'est plus présente dans le génome du phage, mais est apportée par un plasmide modifié: un phagemide. Celui-ci possède en plus de son origine de répllication plasmidique et d'un marqueur de sélection, une origine de répllication phagienne et un gène encodant une PVIII recombinante (Felici *et al.*, 1991). Une fois que des bactéries ont été transformées avec ces phagemides, il suffit de les infecter avec un phage "helper" (M13K07, VCSM13,...) qui porte tous les gènes sauvages nécessaires pour obtenir des phages complets et une origine de répllication légèrement déficiente. Une modification dans la région intergénique du phage helper diminue sa répllication et favorise l'empaquetage du phagemide sous forme simple brin. Dans la nomenclature, on appelle ce type de phage f8+8, ce qui montre l'origine différente des protéines pVIII sauvages et recombinantes exprimées à la surface du phage. Le vecteur de Felici s'appelle pC89.

Le système "phagemide" f8+8 offre plusieurs avantages au niveau de sa manipulation par rapport aux vecteurs phage f88. Premièrement, il offre des taux de transformation des bactéries meilleurs que ceux qui sont obtenus avec les vecteurs f88. De plus la forme double brin est beaucoup plus facile à préparer qui facilite les constructions de mutants dans ce système. Le système phagemide serait aussi capable d'exprimer de plus grandes molécules (Baek *et al.*, 2002).

4.2.2. Anticorps utilisés et mimotopes sélectionnés

Dans le cas de *Brucella* plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques de différents épitopes de la chaîne O du LPS ont été utilisés dans la sélection de mimotopes :B66-2C8, A15-6B3, A76-12B12, B66-4F9 qui reconnaissent respectivement les épitopes A, M, C (A=M) et C/Y (Weynants *et al.*, 1997) (Cloeckaert *et al.*, 1993), (Limet *et al.*, 1989). Les différentes banques utilisées pour ces sélections sont reprises dans la figure 9.

Parmi tous ces mimotopes isolés, dont une majorité étaient des compétiteurs du LPS (tableau-figure 10), seule une minorité induisait des anticorps anti-LPS en modèle murin.

Fields (Fields *et al.*, 1995) a établi qu'il était nécessaire qu'il y existe une similarité dans l'interaction existant entre l'anticorps monoclonal et l'antigène natif ou les peptides mimotopes pour espérer obtenir un mimétisme immunogénique. Cependant, à ce jour, aucune

Clone	Séquence du peptide	Type de peptide	Type de Vecteur	Immunogenicité
2C8-[1]	YGPW <u>C</u> DDTPQAC <u>R</u> SWP	(X) ₄ C(X) ₆ C(X) ₄	F 88-4	-
2C8-[3]	ESKHSC <u>Q</u> IW <u>C</u> DNML	(X) ₄ C(X) ₃ C(X) ₄	F 88-4	-
2C8-[4]	<u>C</u> SIYGSTIAG <u>C</u>	C(X) ₉ C	pC89	-
2C8-[5]	DWPAIWRKQ	(X) ₉	pC89	-
2C8-[6]	WPPPNMLTS	(X) ₉	pC89	-
2C8-[7]	<u>C</u> HHSPEEYEP <u>C</u>	C(X) ₉ C	pC89	(+)
2C8-[8]	PWLDISDFQ	(X) ₉	pC89	-
2C8-[9]	PWRELWASR	(X) ₉	pC89	-
2C8-[10]	TDDK <u>C</u> SHPLI <u>C</u> GLGP	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
2C8-[11]	TQNES <u>C</u> MIW <u>C</u> DTVY	(X) ₅ C(X) ₃ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
2C8-[12]	LVDRRC <u>Y</u> IW <u>C</u> DGPE	(X) ₅ C(X) ₃ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
2C8-[13]	GISEP <u>C</u> LIW <u>C</u> DGNA	(X) ₅ C(X) ₃ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
2C8-[14]	EYPW <u>C</u> DAPNTA <u>C</u> AEPQ	(X) ₄ C(X) ₆ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[1]	PPSF <u>C</u> PNFIP <u>C</u> TDGL	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	-
6B3-[2]	APTQ <u>C</u> SQTWPC <u>P</u> SHL	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	(+)
6B3-[4]	PPPQ <u>C</u> SKAWPC <u>P</u> PTH	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	(+)
6B3-[6]	GPGQ <u>C</u> NTRNPC <u>P</u> RPM	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	(+)
6B3-[7]	DKRMC <u>G</u> LAPC <u>M</u> PSF	(X) ₄ C(X) ₄ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[8]	PQQH <u>C</u> APLKEC <u>E</u> LSP	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[9]	SDQRC <u>S</u> PLKI <u>C</u> TTVG	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[10]	LNQSC <u>A</u> PLREC <u>A</u> LHL	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[11]	APAQ <u>C</u> SAAWPC <u>P</u> LPL	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
6B3-[12]	ANKMC <u>G</u> TVPC <u>H</u> PRV	(X) ₄ C(X) ₄ C(X) ₄	F 88-4	Non testée
4F9-[1]	ARDPQ <u>C</u> TEPELT <u>C</u> AREL	(X) ₅ C(X) ₆ C(X) ₈	F 88-4	-

Figure 10 - Peptides Mimotopes de la chaîne O de *Brucella* obtenus par phage display pour les AcM 2C8, 6B3 et 4F9.

La première et la deuxième colonne donnent le nom et la séquence du mimotope. La troisième indique la structure générale des peptides de la banque dont les mimotopes sont issus. La lettre C est utilisée pour les résidus cystéines fixe. Les lettres X représentent n'importe lequel des 20 acides aminés naturels. Le nom du vecteur utilisé pour construire la banque est indiqué dans la quatrième colonne (rappelons que F88-4 est une vecteur de type F88 et pC89 de type F8+8). La dernière colonne indique si des tests de mimétisme immunologique ont été menés en modèle murin et si le mimotope induisait la production d'anticorps cross-réactif avec le LPS de *Brucella* (De Bolle *et al*, 1999 et Mertens *et al* 2001).

structure de complexe entre un anticorps anti-chaîne O et son épitope ou ses mimotopes n'a pu être résolu par cristallographie suivie de diffraction de rayon X.

4.2.3. Présence de consensus peptidique et analyse de l'interaction mimotope/anticorps par mutagenèse du peptide

D'autres voies d'analyse des interactions existant dans le complexe anticorps-épitope/mimotope ont donc de l'être envisagées. Il a été montré récemment que plusieurs mimotopes de la chaîne O de *Brucella* possédait certaine partie de séquence en commun (Mertens *et al.*, 2001). L'existence de ces consensus dans des peptides mimotopes nous laisse penser qu'elles jouent un rôle direct dans l'interaction avec l'anticorps. Ces données ouvrent donc la voie à des études de mutagenèse qui pourraient déterminer si les consensus sont nécessaires et suffisants pour qu'un mimotope soit bien reconnu par l'anticorps. Une mutagenèse systématique de chaque résidu identifierait également le rôle de chaque résidu du mimotope dans l'interaction avec les anticorps monoclonaux anti-chaîne O de *Brucella* ce qui suppléerait au manque de données structurales sur ce type de complexe.

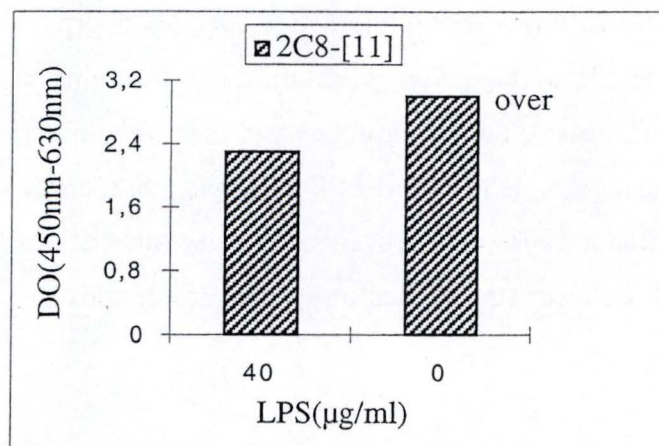


Figure 11 - Affinité du mimotope 2C8 (11) par l'AcM2C8. ELISA d'inhibition avec le LPS W99.

Le phage F88-4/2C8(11) est adsorbé à 10^{12} part./ml sur une plaque maxisorp (NUNC). Il est ensuite incubé avec l'AcM 2C8 seul ou en mélange avec du LPS W99 (40 µg/ml). Le signal obtenu avec le mélange AcM -LPS est plus faible que celui sans LPS ce qui indique que ce dernier est capable d'entraver la liaison de l'AcM 2C8 au mimotope 2C8(11).

Lorsque le signal (DO) était trop élevé pour être mesuré, l'indication "over" accompagne la colonne.

OBJECTIF DU TRAVAIL ET DONNEES PRELIMINAIRES

Lors d'un précédent travail, 14 mimotopes provenant de différents types de banques de peptides présentés à la surface de phage furent sélectionnés avec l'AcM 2C8 (Mertens *et al.*, 2001)(23 mimotopes) (De Bolle *et al.*, 1999)(14 mimotopes).

Nom	Séquence peptidique	Type de banque
2C8-[1]	YGPWCDDTPQACRSWP	88 Cys6
2C8-[2]	ETMWCNPGYPCPDHA	88 Cys5
2C8-[3]	ESKHSCQIWCDNML	88 Cys3
2C8-[4]	CSIYGSTIAGC	8+8-CX9
2C8-[5]	DWPAIWRKQ	8+8-X9
2C8-[6]	WPPPNMLTS	8+8-X9
2C8-[7]	CHHSPEEYEP	8+8-CX9
2C8-[8]	PWLDISDFQ	8+8-X9
2C8-[9]	PWRELWASR	8+8-X9
2C8-[10]	TDDKCSHPLICGLGP	88 Cys5
2C8-[11]	TQNESCMIWCDTVY	88 Cys3
2C8-[12]	LVDRRCYIWCDGPE	88 Cys3
2C8-[13]	GISEPCLIWCDGNA	88 Cys3
2C8-[14]	EYPWCDA	88 Cys6

Lorsque l' on voit la diversité de ces séquences tant dans la taille des peptides que dans leur nature on ne peut que supposer qu'ils n'interagissent pas de la même façon avec l'AcM. Il est alors difficile de prédire les résidus des mimotopes qui sont impliqués dans l'interaction et ceux qui ne le sont pas. Une analyse comparative des séquences de ces peptides-mimotopes révèle la présence de plusieurs consensus dont celui présenté ci-dessous qui est le plus important, tant dans sa longueur que dans le nombre de peptides le possédant :

- 2C8 (11)

TQNESCMIWCDTVY
- 2C8 (12)

LVDRRCYIWCDGPE
- 2C8 (13)

GISEPCLIWCDGNA

2C8 (3) ESKHSCQ**I**W**C**DNML

Consensus XXX**E**SC**X**IW**C**D**G**XX

L'existence de consensus dans des peptides permet de mettre en évidence dans l'ensemble de ceux-ci quels sont les motifs d'acides aminés qui sont importants pour la reconnaissance par l'anticorps. Toutefois, le consensus seul n'est pas une preuve indiscutable du rôle de tel ou tel résidu dans l'interaction avec l'anticorps et nous nous proposons donc de tester expérimentalement l'importance de ce consensus pour la reconnaissance, avec le peptide 2C8(11) comme leader.

Dans un premier temps, l'influence des résidus de la PVIII bordant le mimotope sera évaluée. Nous analyserons ensuite le rôle de chaque résidu du mimotope pour son interaction avec l'AcM 2C8 par "alanine scannig". Finalement, nous déterminerons si le consensus mis en évidence par la comparaison de séquence des mimotopes est suffisant pour permettre l'interaction avec l'AcM 2C8.

RESULTATS

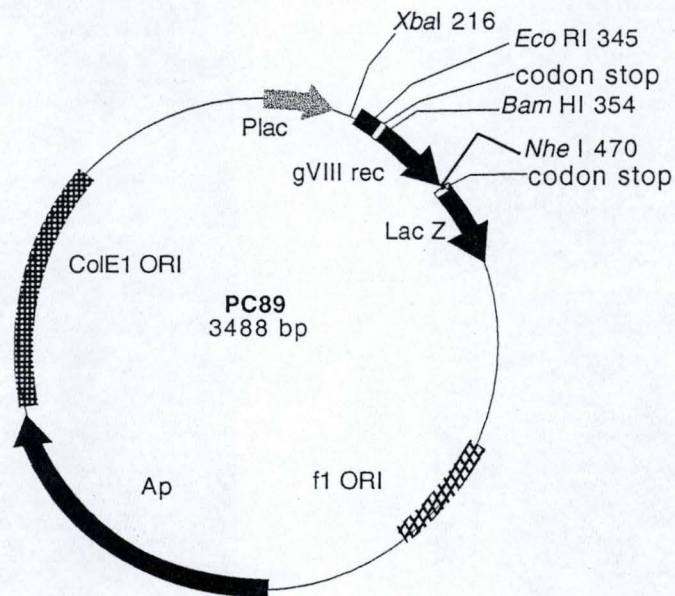
1. Utilisation du phagemide pC89 comme vecteur d'expression du peptide 2C8(11)

Le mimotope qui a été choisi comme base pour les différentes analyses par mutagenèse est le mimotope 2C8(11), celui-ci possède 5 résidus dans le consensus étendu (voir ci-dessous) et une forte affinité apparente pour l'AcM 2C8 (graphe, Figure 11). Bien que les quatre peptides possédant le consensus ait été sélectionnés dans une banque de type f88, il nous a paru judicieux de faire nos différents mutants dans un système phagemide. Comme il a été décrit plus haut, ce type de vecteur offre en effet de nombreux avantages pour les constructions génétiques à effectuer. De plus, le fait de changer de vecteur modifie légèrement les séquence de la PVIII avant et après le peptide (figure 12) ce qui ne devrait pas fortement affecter la reconnaissance. Il faut néanmoins tester la reconnaissance du peptide 2C8 (11) dans un contexte "pC89". Il nous sera dès lors possible de vérifier que les séquences bordant le peptide n'ont pas d'influence sur sa reconnaissance par l'anticorps.

2C8 (11) F88-4	ATQNES CMIWCDTVYPAEGDDPAKA... (PVIII)
2C8 (11) pC89	AEGE FTQNES CMIWCDTVY----GDPAKA... (PVIII)

Figure 12 - Changement de l'environnement du peptide 2C8 (11), selon le vecteur utilisé.

La séquence en gras correspond au mimotope 2C8(11). Autour de cette séquence, les acides aminés diffèrent selon le vecteur utilisé, soit F88-4 ou pC89. Dans le cas du vecteur F88-4, le peptide est séparé de la PVIII par un fragment PAEGD. Dans le vecteur pC89, le fragment EGEF sépare le peptide de l'extrémité amino-terminale de la PVIII. Le peptide est ensuite séparé du reste de la PVIII par un résidu glycine.



Carte génétique du pC89.
(Felici, 1991)

GENES et ORIGINES de REPLICATION

1. Origines de replication:

- a) Col E1 ORI : Replication double brin du phagemide
- b) f1 ori : Syntèse ADN simple brin (génome phage pour encapsidation)

2. Gènes

- a) *gVIII* rec : Encodant la protéine PVIII recombinante
- b) Lac Z: Encodant l'enzyme B-galactosidase.
- c) Ap: Encodant l'enzyme B-lactamase. Gène de résistance à l'ampicilline.

Figure 13- Phagemide pc89

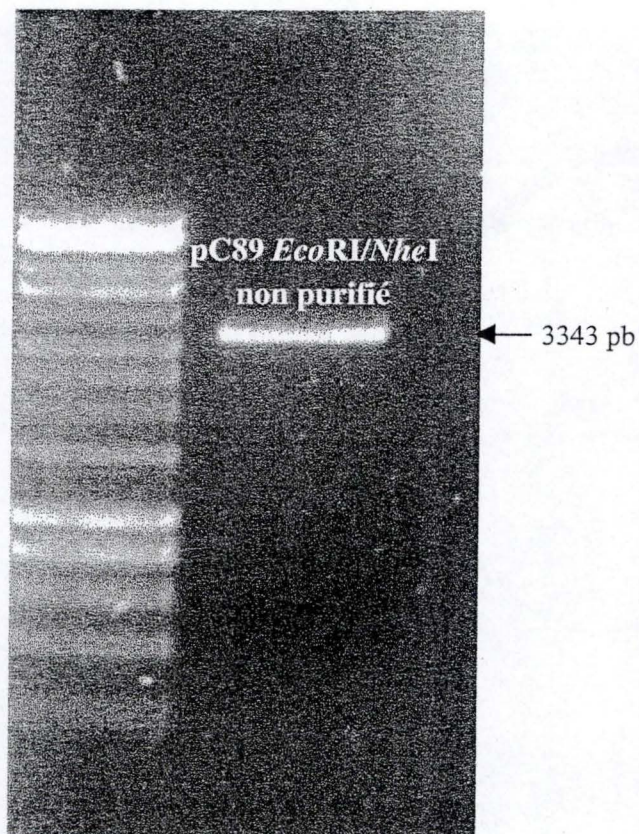


Figure 14 - Restriction de pC89 par les enzymes *Eco RI* et *NheI*.

Gel électrophorèse (0,8% agarose) avec le marqueur de taille HyperLadder(Biolines). On obtient par la restriction de pC89 deux fragments de 3343 pb et 145 pb respectivement. Le petit fragment n'est pas détectable sur ce type gel avec la quantité chargée. 1µl de restriction on été déposé et la concentration du fragment de 3343pb est estimée à 40 ng/µl.

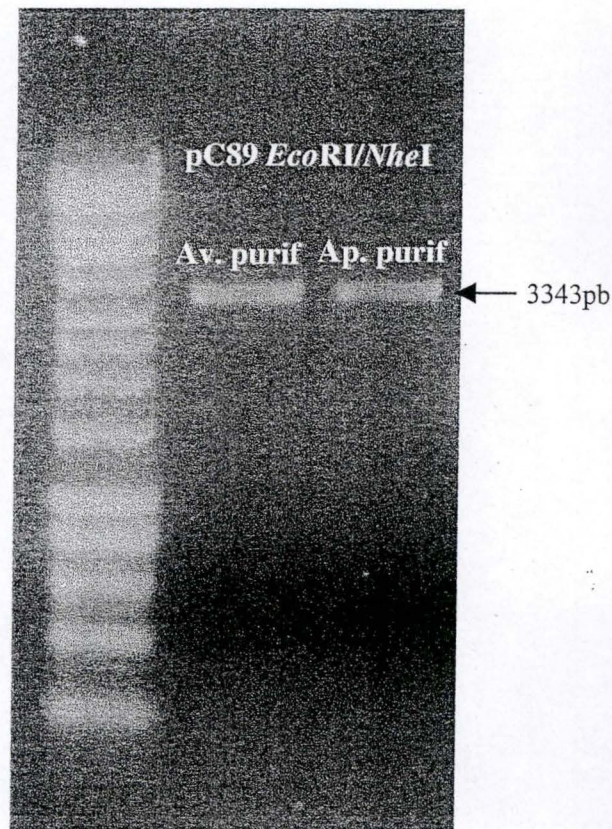


Figure 15 - Matrice pC89 reinteinte avant et après purification.

Gel électrophorèse 0,8% (0,8% agarose) avec le marqueur de taille HyperLadder (Biolines).

La concentration du fragment purifié est estimé à 30 ng/µl.

1.1. Construction du phagemide pC89 exprimant le peptide 2C8 (11)

L'objectif est de cloner la séquence encodant le peptide 2C8 (11) dans le gène recombinant encodant la protéine de capsid PVIII du pC89 (Figure 13). La même expérience sera réalisée avec les peptides "consensus strict" et "consensus étendu" (voir point 3 des résultats).

1.1.1. Préparation de la matrice

Une partie du gène encodant la PVIII du pC89 allant des sites *EcoRI* à *NheI* est excisée par "double" restriction. Le mélange de restriction est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse et le fragment d'intérêt est isolé et purifié.

Restriction et purification du pC89 restreint par *EcoRI* et *NheI*:

En suivant un protocole de restriction de minipréparation de phagemide (paragraphe 4.1.1. de matériel et méthodes), deux fragments de respectivement 3343 paires de base (pb) et 145 pb sont obtenus (Figure 14).

Le fragment de 145 pb pourrait se relier à la matrice lors de l'étape de ligation. Le fragment de 3343 pb est donc isolé à partir d'un gel d'électrophorèse (0,8% agarose) et purifié par adsorption sur de la poudre de silice (kit Bio101, Geneclean III). Le fragment purifié est re-déposé sur un gel 0,8% de manière à évaluer sa pureté et sa concentration (30 ng/μl) par comparaison avec l'intensité des bandes d'un marqueur de taille quantitatif. (Fig 15).

1.1.2. Préparation de l'insert

L'insert est un fragment d'ADN du pC89 possédant en plus la séquence codant pour le peptide 2C8(11). Ce fragment est obtenu par PCR mutagénisante suivie d'une restriction par les enzymes *EcoRI* et *NheI*.

Purification et obtention du fragment contenant la séquence du 2C8(11) par PCR :

L'amorce utilisée en amont pour cette PCR porte la séquence nucléotidique correspondant à

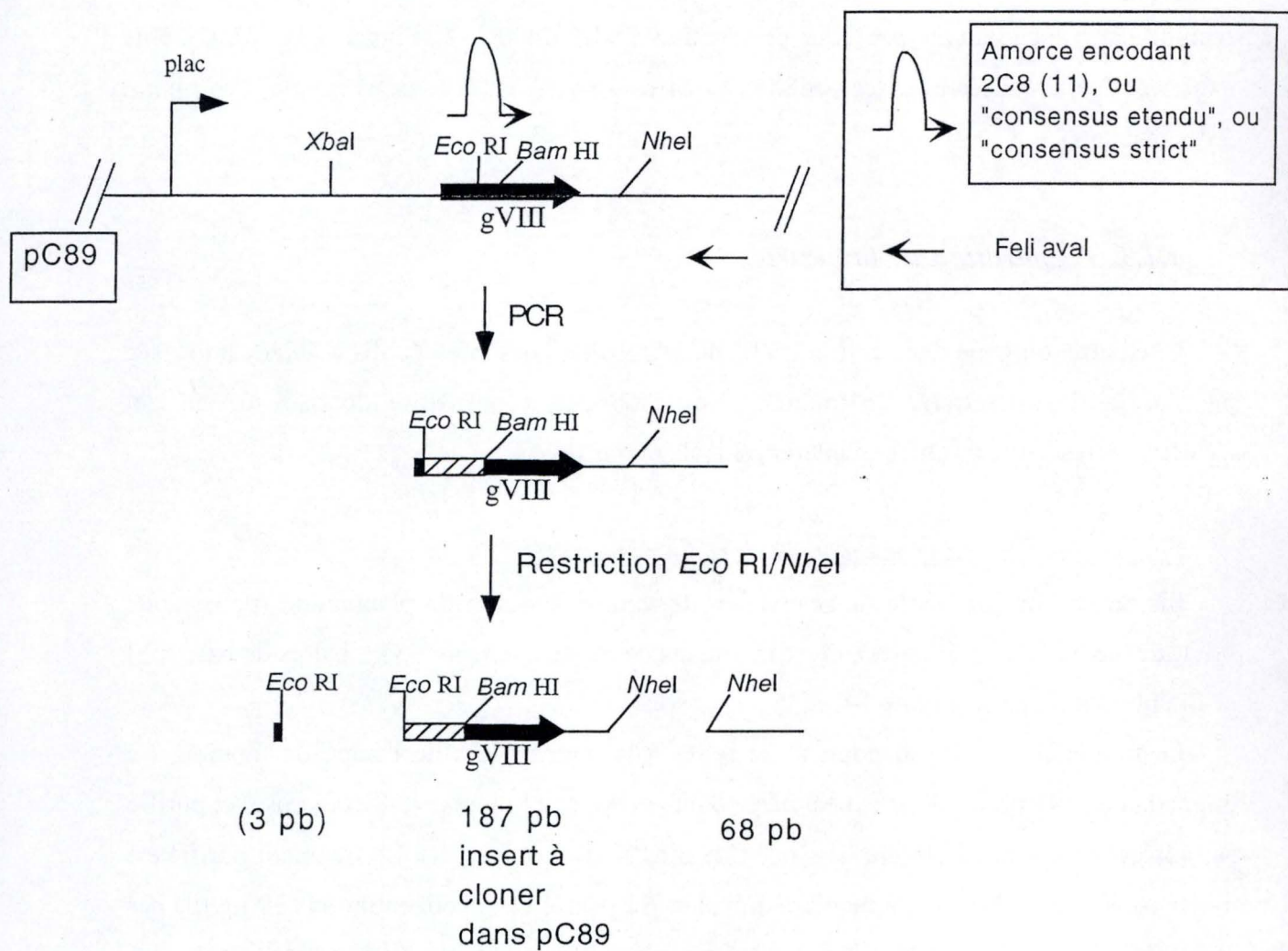


Figure 16- Obtention des inserts encodant 2C8 (11), "consensus étendu" et "consensus strict". Schéma de la PCR et de la double restriction *EcoRI* et *NheI*.

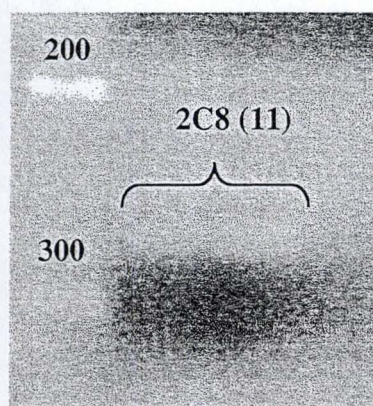


Figure 17 - Gel électrophorèse (1,5 % agarose)

Quantification des produits de PCR 2C8(11), après la purification.

Pour chaque produit PCR, 1 μ l et 3 μ l (de gauche à droite), sont déposés dans les puits du gel. Le marqueur de taille se trouve dans le premier puit.

La concentration de l'ADN de chaque échantillon purifié est calculée par rapport à l'intensité des bandes du marqueur (Smart ladder SF, Eurogentec). Pour les produits PCR "2C8 (11)" la concentration est estimée à 20 ng/ μ l.

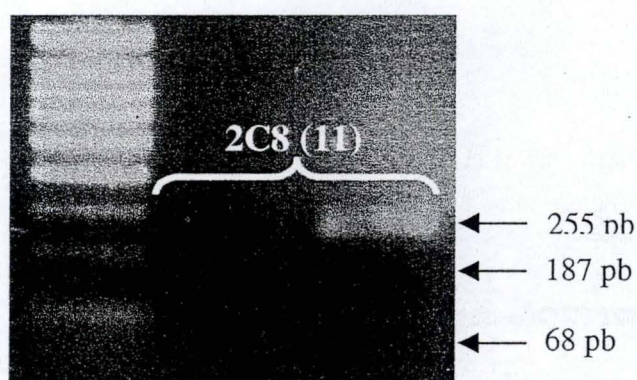
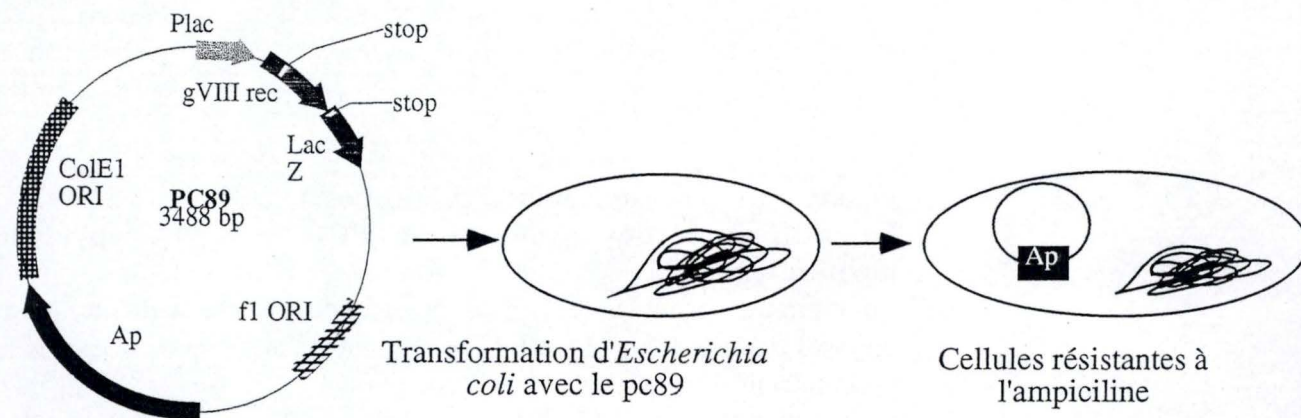


Figure 18 - Gel électrophorèse (agarose 1,5 %)

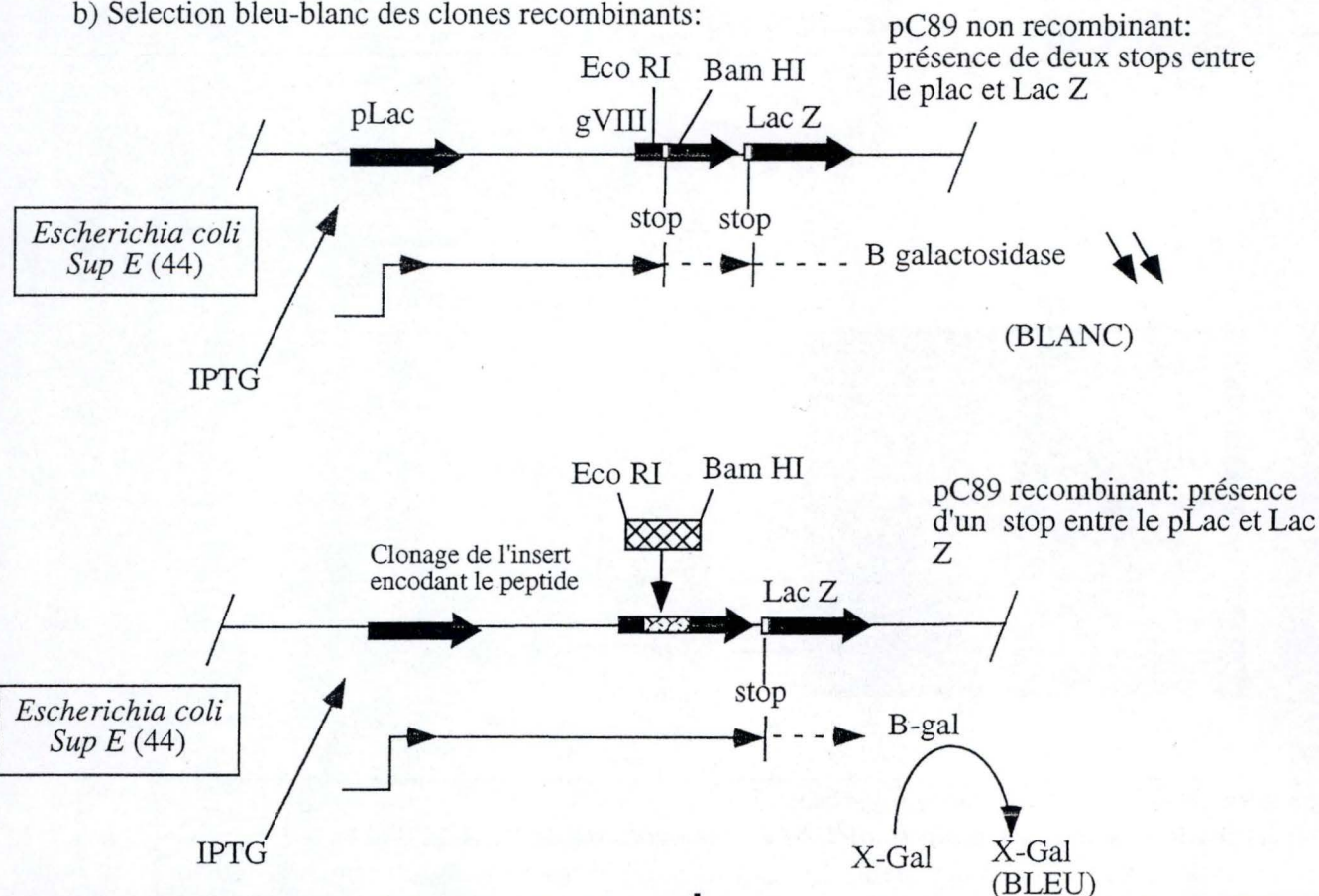
Vérification de la restriction *EcoRI/NheI* des produits de PCR 2C8 (11).

Le marqueur de taille (Smart Leader SF, Eurogentec) se trouve dans le premier puits. 2 μ l du produit PCR purifié après restriction et avant restriction (taille 255pb) et ont été déposés dans le deuxième et le troisième puits respectivement. La restriction de ces produits PCR donne des fragments de 187pb, 68pb et 3pb (indétectable sur ce type de gel). C'est le fragment de 187pb qui sera ultérieurement cloné dans le pC89. Sa concentration est estimée à 20 ng/ μ l. La bande visible à 255 pb dans les échantillons post-restriction correspond à une restriction partielle minime.

a) Selection des transformants :



b) Selection bleu-blanc des clones recombinants:



Figures 19 et 20 - Phagemide pC89.

La sélection des clones transformants (possédant le phagemide pC89) se fait sur milieu sélectif (ampicilline) grâce au gène encodant la résistance à l'ampicilline (Ap) porté par pC89.

La sélection des clones recombinants (possédant le phagemide avec l'insert) se fait par criblage bleu-blanc. Le gène codant pour la PVIII qui est sous le contrôle du promoteur Plac est en fusion traductionnelle avec le gène encodant la β -galactosidase. Cependant, il y a deux codon stop (UAG) qui entravent la production de cette protéine de fusion. Le premier se trouve au début du gène gPVIII et constitue le site de clonage des inserts codant pour les peptides. Le second se trouve juste à la jonction entre les deux gènes. Dans les souches d'*Escherichia coli* dites *supE* (ex: DH11S) un acide aminé glutamine remplace le stop dans 10 % des protéines. Si les deux codon TAG sont présent dans la séquence, trop peu de β -galactosidase de fusion sont produites et les colonies sont blanches sur du milieu contenant du X-Gal. En revanche, si le premier stop est éliminé par l'insertion de la séquence encodant le peptide, 10% des protéines PVIII sont fusionnées à la β -galactosidase et la colonie apparait bleutée sur du milieu contenant du X-Gal.

2C8 (11) à cloner et un nouveau site *EcoRI*. La seconde amorce se nomme "feli aval" et s'hybride suffisamment en aval du gpVIII du pC89 pour permettre de conserver le site *NheI*. La matrice utilisée est une minipréparation du pC89 diluée 100 fois (Schéma PCR, Figure 16). Un produit d'une taille voisine au produit attendu (255 pb) a été obtenu. La purification sur colonne (PCR purification, Gibco) du produit PCR permet d'enlever les primer, les enzymes et les autres composants utilisés pour l'amplification. Le produit PCR purifié est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse (1,5% agarose) pour vérifier sa pureté et sa concentration (qui a été ici estimée à 20ng/μl) (Figure 17).

Restriction et purification de l'insert 2C8(11) :

Le produit PCR purifié est restreint par les enzymes *EcoRI* et *NheI* (protocole décrit dans le paragraphe 4.1.2. du matériel et méthode) et la bande dont la taille correspond à celle de notre insert est purifiée (taille) de la même manière que la matrice mais à partir d'un gel d'agarose 1,5%. La concentration de l'insert restreint (vérification Figure 18) a été estimée à 10 ng/μl sur gel agarose 1,5%.

1.1.3. Ligation et Transformation

La ligation entre la matrice et l'insert a été réalisée suivant le protocole décrit dans le matériel et méthode (Kit de Ligation Rapide, Roche, protocole au paragraphe 4.2.1.) avec 100 ng de matrice et 27,96 ng d'insert. Des *Escherichia coli* DH11S sont transformées avec le produit résultant et étalées sur du milieu de culture contenant de l'ampicilline (100 μg/ml), de l'IPTG (1mM) et du X-Gal ($3 \cdot 10^{-3}\%$ w/v). Seules les colonies possédant le pC89 (résistance à l'ampicilline) avec le nouvel insert apparaissent bleues (figures 19 et 20).

1.1.4. Séquençage

Le séquençage permet de vérifier si le nouvel insert présent dans le pC89 ne présente pas de mutation non désirée.

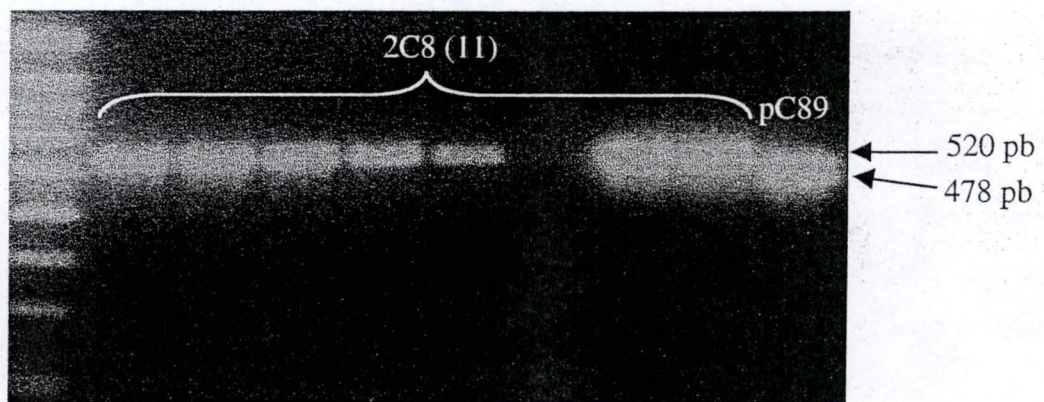


Figure 21 - Gel électrophorèse (Agarose 0,8 %)

PCR sur colonies transformées avec pC89/2C8(11).

Marqueurs de taille utilisés: premier puits Smart Ladder SF (Eurogentec)

L'amplicon utilisé comme contrôle de taille (PCR avec pC89 comme template) se trouve bien plus bas que tous nos échantillons. Tous les clones testés sont bien recombinants

Pour chaque échantillon, 5 µl de produit de PCR sont déposés sur gel. La présence des inserts dans pC89 augmente la taille de l'amplicon à 520 pb. Toutes les PCR réalisées sur des colonies transformées avec pC89/2C8(11) étendu ont fonctionné, sauf la 6^{ème}.

PCR sur colonies, purification des produits de PCR et séquençage :

Des PCR sur 8 colonies bleues sont réalisés avec des amorces s'hybridant respectivement à 295 pb en amont du site *EcoRI* (amorce feli amont, paragraphe 1.1.4. de matériel et méthodes) et à 67 pb en aval du site *NheI* (amorce feli aval, paragraphe 1.1.4. de matériel et méthodes). Ces amplicons servent tout d'abord à confirmer la présence de l'insert par comparaison de leur taille avec celle d'un amplicon provenant d'une PCR réalisée avec les mêmes amorces sur le vecteur pC89 vide (Figure 21). On remarque que la présence de l'insert dans pC89 augmente la taille de l'amplicon à 520 pb. Il est ensuite purifié et séquencé avec l'amorce feli seq (paragraphe 2.3. de matériel et méthode) comme indiqué dans le matériel et méthode. Deux clones possédant la séquence attendue ont été sélectionnés.

1.2. Test de comparaison de 2C8 (11) f88-4 avec 2C8 (11) pC89

Avant de réaliser une mutagenèse par "alanine scanning" sur le peptide 2C8(11) cloné dans pC89, il faut s'assurer qu'en le changeant de vecteur, le mimotope ne perd pas son affinité pour l'AcM 2C8.

Le mimotope 2C8(11) va donc dans un premier temps être exprimé à la surface des deux systèmes de phage, f88-4 et pC89. Ces phages seront quantifiés et un ELISA déterminera s'il n'y a pas de perte d'affinité de l'AcM 2C8 pour le mimotope 2C8(11) dans pC89.

1.2.1 Production de phages pour les systèmes d'expression phagemide et phage

Le protocole de production de phage est légèrement différent quand il s'agit d'un système F88 ou F8+8. Les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour les vecteurs f88-4 et pC89 sont respectivement K91KAN et DH11S. Dans les deux cas, une préculture est produite à partir d'une colonie isolée sur boîte. Cette préculture sert ensuite à ensemencer une culture de 80 ml. Dans le système F88-4, les phages sont produits de façon continue sans induction tandis que dans le système pC89, du phage "helper" est ajouté à la culture à une densité optique de 0,15-0,25 et l'expression de la PVIII recombinante est induite grâce à l'addition d'IPTG 1mM. Après purification des phages à partir de la culture, on en détermine la concentration en nombre de particules/ml par spectrophotométrie et en nombre de cfu/ml (Colonies Forming

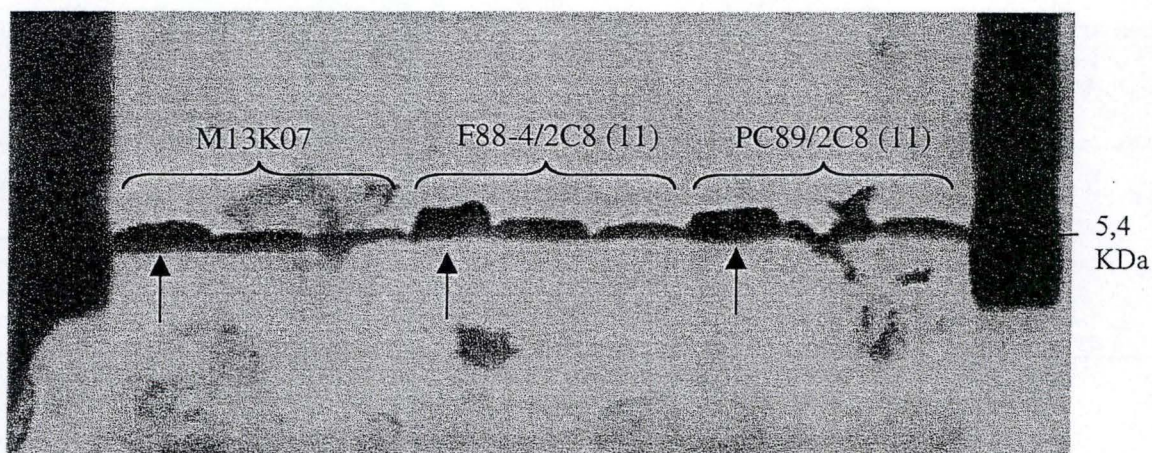


Figure 22 - SDS-PAGE.

Quantification des protéines PVIII par SDS-PAGE.

Marqueur de poids moléculaire Kaléidoscope Polypeptide (Bio-Rad).

Les concentrations (calculées par infection) des premières dilutions de chaque échantillon sont respectivement de $5,3 \cdot 10^9$ CFU/ml pour le M13K07 de $1,5 \cdot 10^9$ CFU/ml pour le F88-4/2C8 (11) et de $2,3 \cdot 10^{11}$ CFU/ml pour pC89/2C8 (11). Les deux puits suivants correspondent à des dilutions de 2 en 2.

Les seules bandes visibles correspondent à la protéine pVIII (5,4 KDa). Les protéines de capside restantes ne sont pas visibles à cette concentration de CFU/ml.

Les bandes signalées par une flèche semblent contenir une même quantité de PVIII. La concentration de ces échantillons en particule/ml a donc été normalisée à $1,61 \cdot 10^{11}$ particules/ml, concentration du M13K07 dans le premier puits.

Unit/ml) par comptage après infection (paragraphe 6.3. de materiel et méthodes). Ces méthodes de dosages ont respectivement donné $2,25 * 10^{11}$ part/ml et $5,75 * 10^{14}$ CFU/ml pour les phages F88-4/2C8(11) et pC89/2C8(11).

1.2.2. Evaluation du nombre de PVIII par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)

L'objectif de cette manipulation est de normaliser la concentration de phages (en particules/ml) pour étudier après l'affinité de l'anticorps monoclonal 2C8 par le peptide 2C8 (11). Le SDS-PAGE (paragraphe 2.1. de materiel et méthodes) permet une migration de protéines en conditions dénaturantes (SDS et dithiothreitol) en fonction de la masse.

Les protéines de la capside du phage vont être dénaturées et chargées dans le gel de SDS-polyacrylamide. Le temps de migration est long (24H), parce que la PVIII est une petite protéine (5,4 KDa) pour laquelle on veut obtenir une bonne séparation. La révélation de la protéine est faite par coloration à l'argent (Silver Staining Plus. Kit BioRad) en suivant le protocole.

Les résultats (Figure 22) nous montrent la bande qui correspond à la protéine PVIII, par rapport au marqueur Kaléidoscope (figure 40 dans le paragraphe 2.1. de matériel et méthodes) et au phage M13K07, pour normaliser le nombre de part/ml par rapport à M13K07. La concentration normalisée est $1,61 * 10^{11}$ part/ml. Notons qu'on ne détecte pas la protéine PVIII recombinante, qui devrait présenter une masse plus élevée (7,3 KDa).

1.2.3. Test de l'affinité de l'AcM 2C8 pour les phages F88-4/2C8(11) et pC89/2C8(11) en ELISA

Ce test permet de comparer l'affinité de l'AcM 2C8 pour le mimotope 2C8(11) exprimé dans les deux vecteurs (paragraphe 7.1. de matériel et méthodes), pour autant que la proportion de PVIII recombinante soit comparable sur les phages.

Quatre dilutions (de 5 en 5) contenant un même nombre de PVIII (calculé sur base des résultats du SDS page), de chaque échantillon de phage sont adsorbées en quadruplate au fond des puits d'une plaque MaxiSorp (Nunc). L'expérience est faite en duplicat, pour permettre

une révélation avec l'AcM 2C8 mais aussi avec un anticorps monoclonal anti-pVIII, qui servira à vérifier qu'il y a bien le même nombre de pVIII dans chaque puits.

Nos résultats (figures 23A et 23 B, graphiques) montrent que pour une concentration identique en pVIII totale, l'AcM 2C8 donne pratiquement une même intensité de signal pour f88-4/2C8 (11) et pC89/2C8 (11). Le mimotope 2C8(11) exprimé dans le vecteur pC89 étant toujours reconnu par l'AcM 2C8, il peut donc être utilisé dans les expériences de mutagenèse par "alanine scanning".

2. Alanine Scanning du mimotope 2C8(11) exprimé dans le pC89

L'alanine scanning (Fersht & Winter, 1985) est une méthode de mutagenèse qui consiste à remplacer par une alanine chaque acide aminé de la séquence d'un peptide ou d'une protéine soit de façon individuelle soit en remplaçant plusieurs résidus du peptide à la fois (Combinatorial Alanine Scanning (Morrison & Weiss, 2001)). Le choix du résidu alanine (Figure 24) pour la substitution s'explique par le fait que c'est un résidu non chargé, peu hydrophobe et de petite taille. C'est donc un résidu assez neutre pour l'interaction avec l'AcM, sans toutefois introduire trop de flexibilité comme le ferait la glycine. On la retrouve aussi bien dans les feuillets β , dans les hélices α que dans les boucles (loop et turn) des protéines, (Morrison and Weiss, 2001) (Cunningham & Wells, 1989).

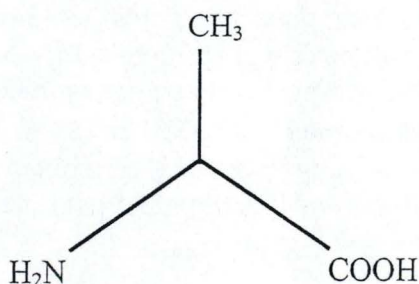


Figure 24 – Alanine (Ala, A)

Poids moléculaire : 71,09.

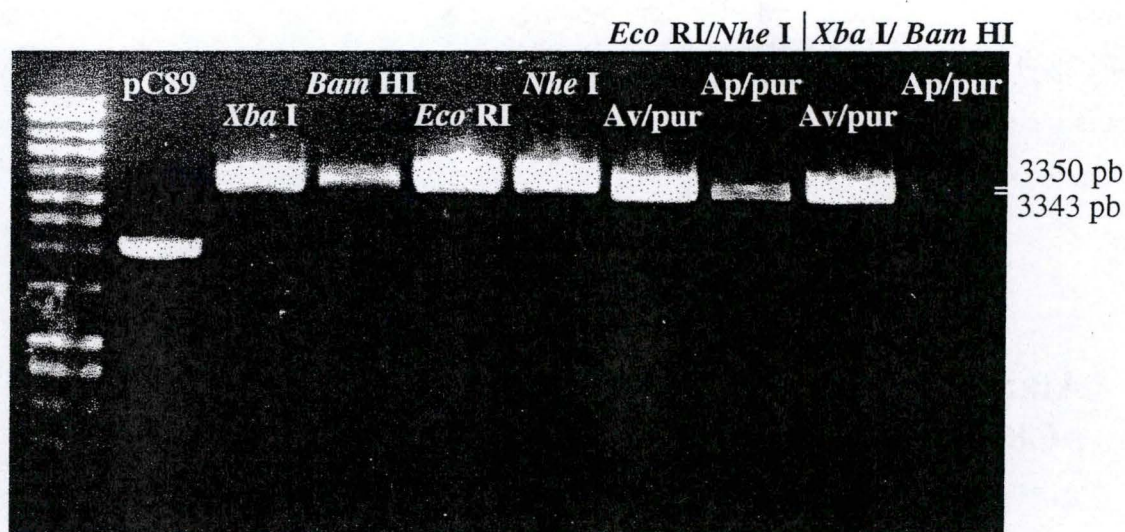


Figure 25 – Gel d'électrophorèse (agarose 0,8 %).

Vérification des différentes restrictions du phagemide pC89. Quantification de la matrice de l'Alanine Scanning.

Marqueur de taille : Hyper Ladder (Biolines), premier puits.

Le second puits contient 0,5 µl de phagemide pC89 (605 ng/µl) non restreint; une seule des trois bandes caractéristiques de la migration d'un plasmide est visible. Dans les quatre puits suivants, les enzymes de restriction utilisées pour les différents clonages sont testées (*Xba* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nhe* I). Un volume de 10 µl (30 ng/µl) de pC89 restreint est déposé dans chaque puits. On observe que la restriction par l'enzyme *Bam* HI n'est pas complète. Un excès de l'enzyme sera donc utilisé pour les restrictions suivantes.

Pour les doubles restrictions (soit *Eco* RI/*Nhe* I, soit *Xba* I/ *Bam* HI) une même quantité de matrice avant et après restriction est déposée dans chaque puits.

La double restriction *Eco* RI/*Nhe* I donne deux fragments de 3343 et 145 pb (ce dernier n'est pas visible pour la quantité de matrices chargées sur gel). La concentration du fragment de 3343 pb purifié (piste *Eco*RI/*Nhe*I Ap/pur, 3,1 µl) est estimée à 16,6 ng/µl. Pour la double restriction *Xba* I/*Bam* HI, des fragments de 3350 et 138 pb (le petit fragment n'est pas visible pour la quantité de matrices chargées sur gel) sont obtenus. La concentration du fragment de 3350 pb purifié (piste *Xba*I/*Bam*HI Ap/pur, 3,1 µl) est estimée à 8,3 ng/µl.

Av/pur : Avant purification

Ap/pur : Après purification

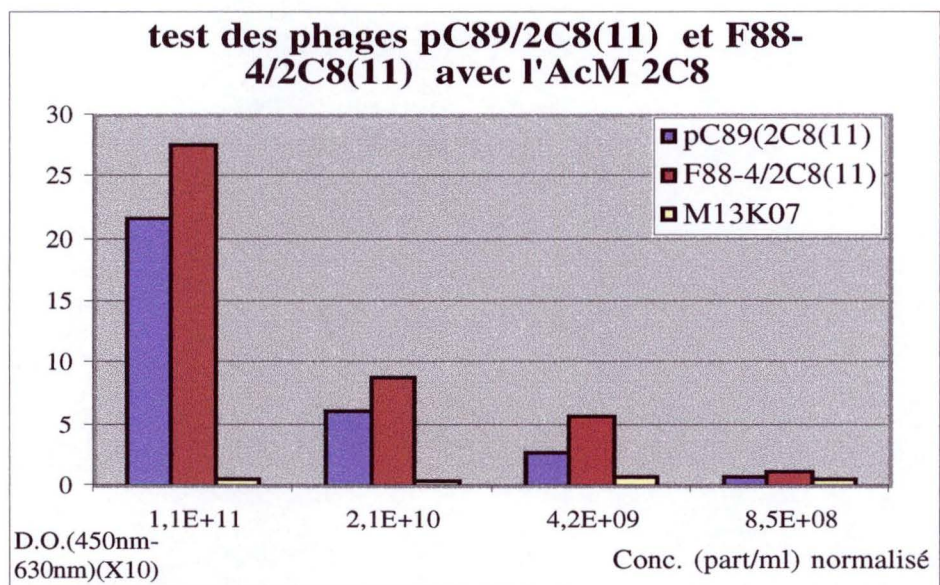


Figure 23 A

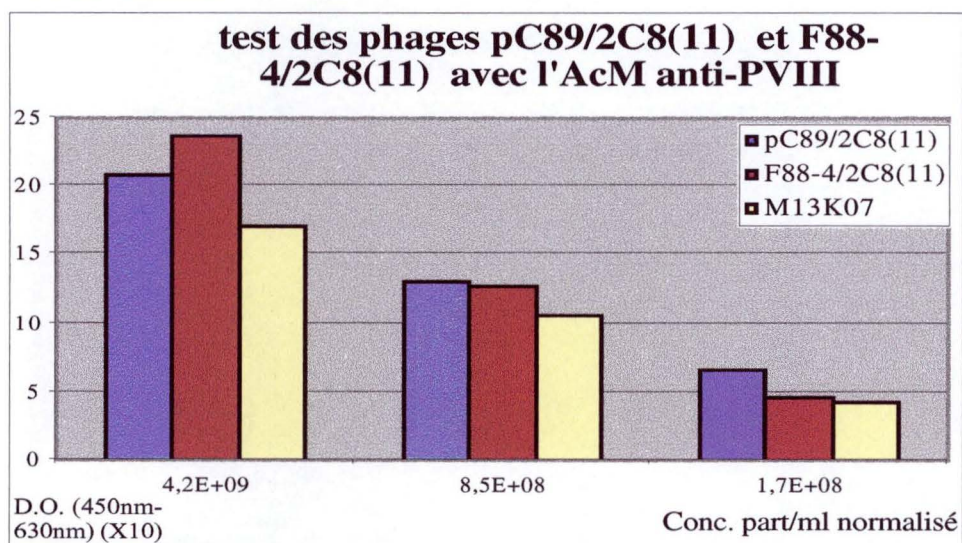


Figure 23 B

Figures 23 A et 23 B

Comparaison entre la reconnaissance entre l'AcM 2C8 et pC89/2C8 (11) ou F88-4/2C8(11).

Figure 23 A :

Les différentes dilution de phages sont adsorbées et testées avec l'AcM 2C8. L'intensité de la reconnaissance est déduite à partir de la valeur de DO à 450nm obtenue après la révélation au K-Blue. On observe que pour chaque dilution des préparations de phage, celle du F88-4/2C8(11) sont très légèrement mieux reconnues que celle du pC89/2C8(11). Le phage M13KO7 n'est pas reconnu par l'AcM2C8 et sert de contrôle négatif. Le LPS de *Brucella* W99 (A dominante) a été utilisé comme contrôle positif (donné non montrée).

Figure 23 B :

Les concentrations des différentes préparation phages sont semblables puisque chaque dilution donne un signal comparable avec l'aCM antiPVIII..

L’objectif sera de remplacer successivement chaque résidu du peptide 2C8(11) par une alanine de façon à déterminer si seuls les résidus du consensus sont indispensables ou si d'autres résidus interagissent directement avec l'AcM 2C8. Ce scan permet donc de déterminer pour chaque acide aminé du peptide s'il a une influence bénéfique ou néfaste pour l'interaction (Lang *et al.*, 2000) (Lu *et al.*, 2001) (Parhami-Seren *et al.*, 2001).

2.1. Construction des phagemides pC89 exprimant les peptides 2C8(11) mutés par Alanine Scanning

Les séquences nucléotidiques des peptides 2C8(11) mutés systématiquement et ponctuellement par une alanine sont obtenues par PCR et clonés dans le gène encodant la protéine de capsid PVIII du pC89.

Les séquences peptidiques des mutants 2C8(11) sont reprises ci-dessous :

2C8 (11)	TQNEscMIWCDTVY
T1	AQNEscMIWCDTVY
Q2	TANEscMIWCDTVY
N3	TQAEscMIWCDTVY
E4	TQNAscMIWCDTVY
S5	TQNEAscMIWCDTVY
C6	TQNEsAMiWCDTVY
M7	TQNEscAIWCDTVY
I8	TQNEscMAWCDTVY
W9	TQNEscMIACDTVY
C10	TQNEscMIWADTVY
D11	TQNEscMIWCATVY
T12	TQNEscMIWCDAVY
V13	TQNEscMIWCDTAY
Y14	TQNEscMIWCDTVAA

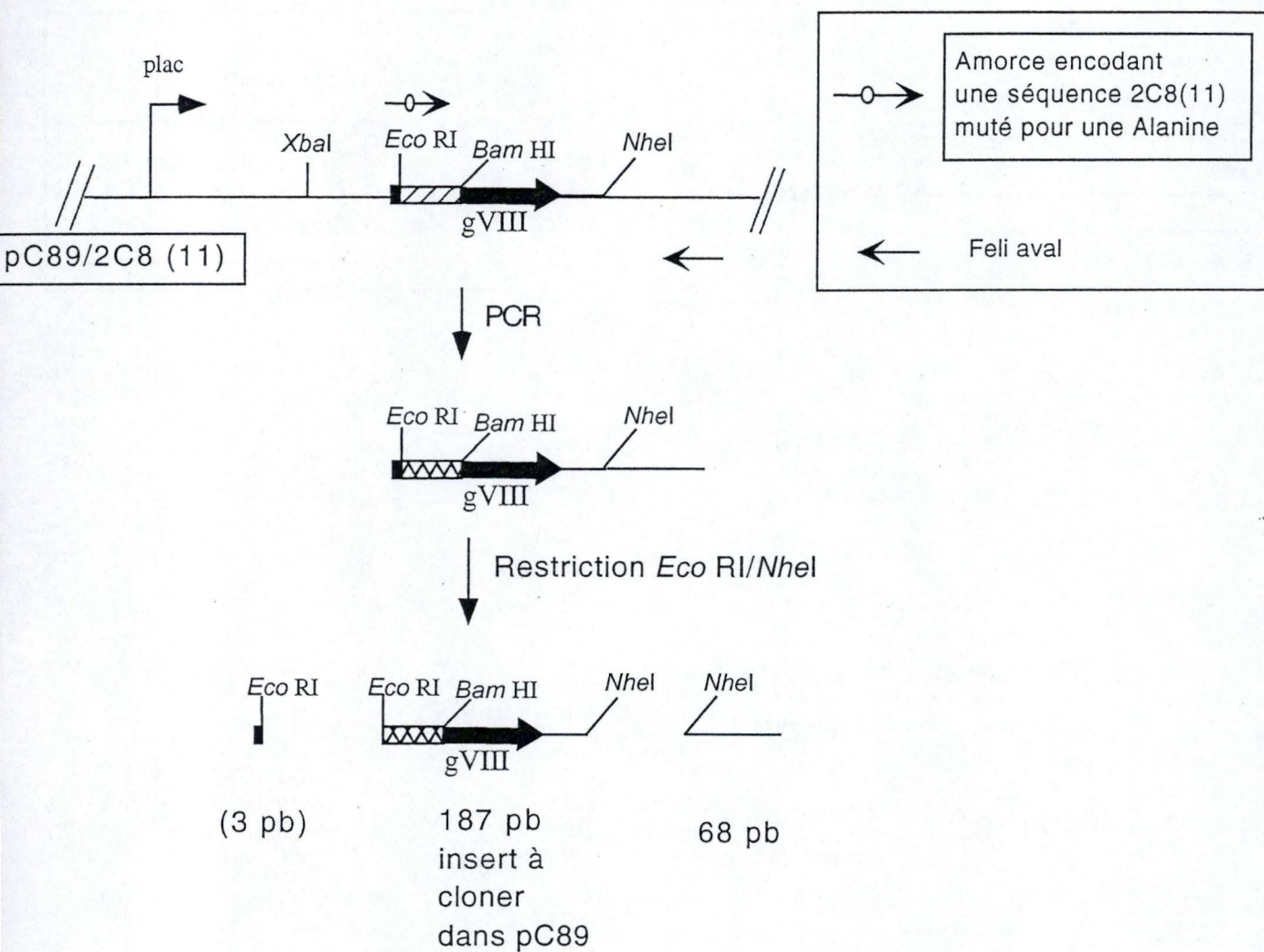


Figure 26 - Obtention des inserts encodant des séquences du peptide 2C8 (11) muté ponctuellement par Alanine à la position T1, Q2, N3, E4, S5, C6, M7. Schéma de la PCR et de la double restriction *Eco*RI/*Nhe*I.

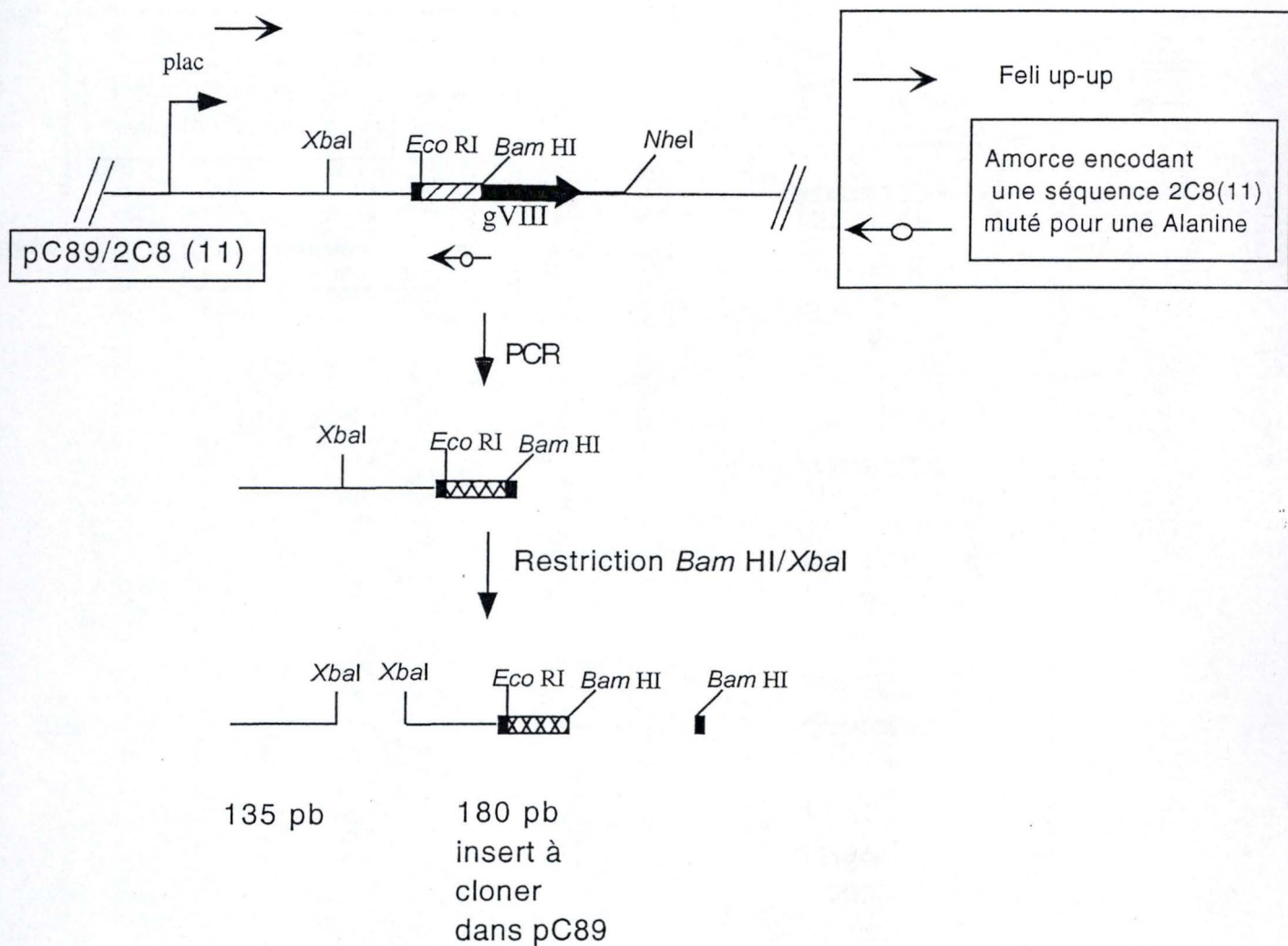


Figure 27 - Obtention des inserts encodant des séquences du peptide 2C8 (11) muté ponctuellement par Alanine à la position I8, W9, C10, D11, T12, V13, Y14. Schéma de la PCR et de la double restriction *Bam*HI et *Xba*I.

2.1.1. Préparation de la matrice

Deux types de matrices ont été préparées :

Dans le premier cas, il s'agit du fragment de 3343 pb de pC89 restreint par les enzymes *EcoRI* et *NheI*. Les méthodes utilisées pour la restriction, la purification et la quantification de cette matrice sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 1.1. du chapitre "Résultats" concernant la construction du pC89/2C8(11). La concentration de la matrice pC89 restreinte au site *EcoRI* et *NheI* et purifiée est de 16,6 ng/ml. (Fig25)

Dans le second cas, la restriction du vecteur pC89 par les enzymes *XbaI* et *BamHI* permet d'obtenir deux fragments de 3350 et 138 pb. C'est le fragment de 3350 pb qui va servir de matrice. Après la restriction de pC89 par les enzymes *XbaI* et *BamHI*, le fragment de 3350 pb est récupéré sur gel d'électrophorèse (agarose 0,8 %) et purifié sur colonne bio101 (kit Bio101, GenecleanIII). La concentration de la matrice pC89 est finalement évaluée par comparaison avec celle d'un marqueur de taille quantitatif sur gel d'électrophorèse (agarose 0,8 %) (Figure 25). Elle est estimée à 8,3 ng/μl.

2.1.2. Préparation des inserts

Les différents mutants de l'alanine scanning de 2C8(11) ont été préparés par PCR avec des amorces introduisant les mutations adéquates. Ces produits PCR obtenus et purifiés sont alors restreints soit par *EcoRI* et *NheI*, soit par *XbaI* et *BamHI* et clonés dans la matrice correspondante (Schema figures 26 et 27).

Obtention des mutants "alanine scanning" par PCR mutagénique:

Le template utilisé dans ces PCR est une minipréparation du phagemide pC89/2C8(11). Deux types de couple d'amorces ont été utilisés suivant qu'il fallait obtenir un insert clonable aux sites *EcoRI/NheI* ou en *XbaI/BamHI* de pC89. Pour les inserts clonables aux sites *EcoRI/NheI*, l'amorce utilisée en amont contient le site de restriction *EcoRI* et un fragment de la séquence nucléique du 2C8(11) contenant la mutation voulue. L'amorce utilisée en aval est "feli aval" (taille du produit PCR : 255 pb). Pour les inserts clonables aux sites *XbaI/BamHI*, l'amorce utilisée en amont se nomme feli up-up et s'hybride 116 pb avant le site *XbaI* de

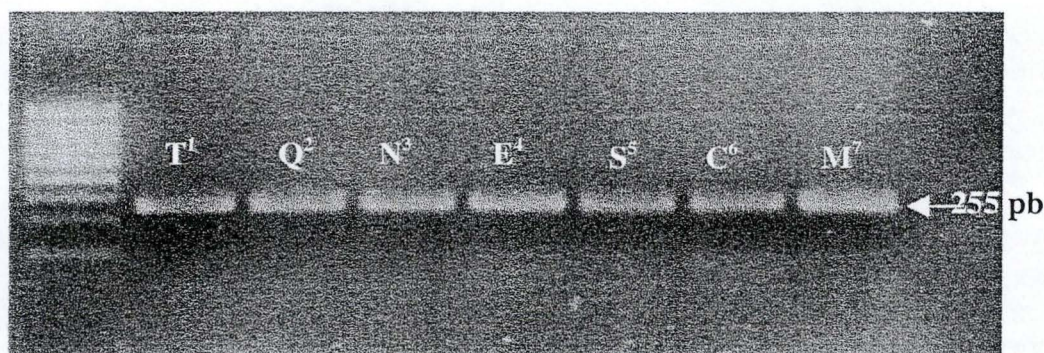


Fig. 28 A

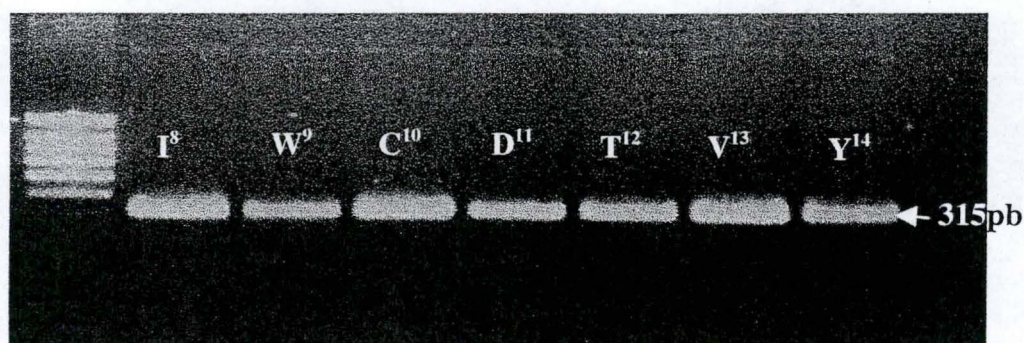


Fig. 28 B

Figures 28 A et 28 B – Gel électrophorèse (agarose 1,5 %)

Analyse des amplicons de l'Alanine scanning:

Marqueur de taille : Smart Ladder SF (Eurogentec) (premier puits des deux gels).
 5 µl des produits de PCR sont déposés sur le gel. La taille des produits de PCR de T¹ à M⁷ est de 255 pb (Figure 28A). La taille attendue des produits PCR d'I⁸ à Y¹⁴, est de 315pb (Figure 28B). Pour chaque échantillon un fragment de taille attendue est obtenu. La bande visible au-dessus de chaque échantillon et qui est en dehors des limites de taille du marqueur correspond à la trace du phagemide pC89-2C8 (11) utilisé comme template dans la PCR. On estime la concentration des produits de PCR à 20 ng/µl.



Figure 29 – Gel électrophorèse (agarose 1,5%)

Estimation de la concentration des produits de PCR de l'Alanine Scanning restreints et purifiés.

Le marqueur de taille (Smart Ladder SF, Eurogentec) se trouve dans le premier puits. 5 µl des produits de PCR restreints et purifiés sont déposés dans chaque puits; leur concentration est estimée à 6 ng /µl pour le produit muté sur I⁸; 4ng/µl pour le produit muté sur V¹³, et 1 à 2 ng/ µl pour le reste des produits de PCR.

pC89. L'amorce utilisée en aval comporte le site *Bam*HI et la fin de la séquence nucléique du mimotope 2C8(11) muté à la position adéquate (taille du produit PCR : 315 pb).

Les produits PCR sont ensuite purifiés sur colonne (GENECLEAN Turbo for PCR system) et leur concentration est évaluée sur un gel d'électrophorèse (Agarose 1,5 %) (Figures 28A et 28B).

Restriction et purification des produits de PCR

105 ng de produit PCR sont engagés dans les restrictions *Eco*RI/*Nhe*I ou *Xba*I/*Bam*HI. Les protocoles de ces réactions sont les mêmes que ceux utilisés lors de la préparation de l'insert pour la construction du phagemide pC89/2C8(11).

La taille des fragments attendus pour le clonage est respectivement de 187pb pour la restriction *Eco*RI/*Nhe*I (Figure 28A) et de 180 pb pour la restriction *Xba*I/*Bam*HI (figure 28B). Ces inserts sont récupérés sur un gel d'électrophorèse (agarose 1,5 %) et purifiés sur une colonne GenecleanIII. La concentration et la pureté des fragments qui vont servir d'insert au clonage sont vérifiées sur un gel d'électrophorèse (agarose 1,5 %) (Figure 29).

2.1.3. Ligation et Transformation

Les conditions de ligation et de transformation des phagemides de l'alanine scanning sont les mêmes que celles décrites pour le pC89/2C8(11) au point 1.1.3 du chapitre "Résultats".

2.1.4. Séquençage

PCR sur colonies

Comme pour le séquençage de pC89/2C8(11), des PCR avec les amorces « feli amont » (paragraphe 1.1.4. de matériel et méthodes) et "feli aval" ont été réalisées sur 7 colonies de chaque mutant. Une PCR sur une minipréparation de pC89 sans insert a été utilisée comme contrôle de taille et une PCR sans template a servi de contrôle négatif.

L'analyse du gel d'électrophorèse (agarose 1,5 %) sur lequel ont été déposés nos échantillons révèlent la présence systématique d'une bande contaminante (non montré).

Séquencage de maxipréparation des phagemides de l'alanine scanning

Pour contourner le problème posé par cette bande parasite qui persistait lors de nos amplifications PCR sur colonie, les phagemides des différents mutants ont été extraits et purifiés. Une préculture pour 3 colonies de chaque mutant a été réalisée. L'extraction et la purification des phagemides s'est faite à l'aide du kit de maxipréparation de plasmide Nucleobond AX 100 (Macherey-Nagel).

La concentration en ADN de ces différentes minipréparations a été évaluée sur un gel d'électrophorèse (agarose 0,8%) et les phagemides contenant l'insert ont été séquencés à l'aide de l'amorce "feli seq".

Pour chaque mutant, nous avons obtenu au moins un clone dont la séquence était correcte.

2.2. Test des mutants alanine

Les différents mutants de l'alanine scanning ayant été obtenus et séquencés, une analyse de leur affinité pour l'AcM 2C8 va permettre de mettre en évidence quels sont les résidus importants ou dispensables du mimotope 2C8(11).

Des surnageants des phages porteurs des peptides de "l'alanine scanning" vont être produits puis testés en Dot Blot avec l'AcM 2C8.

2.2.1. Préparation de surnageant de phage

Préculture et culture des cellules DH11S recombinantes

Quatre colonies sont prélevées pour chaque mutant et servent à ensemer 400 µl de préculture (les précultures comme les cultures se font dans du milieu LB liquide additionné d'ampicilline 100 µg/ml et de streptomycine 30 µg/ml). Après douze heures d'incubation à 37°C la densité optique à 630nm de chaque préculture est mesurée (lecteur de plaques EL 340, Bio-tek instruments) et corrigée par une seconde mesure à 600nm de 10 précultures sur un spectrophotomètre (Ultrospec II, Biochrom).

La culture d'un volume total de 700 µl estensemencée avec un volume de préculture telle que la densité optique initiale à 600 nm soit de 0,05 (paragraphe 7.2. de matériel et méthodes).

Surinfection avec le phage helper et préparation de surnageant de phage

La surinfection par le phage helper permet de produire des phages recombinants dont une partie des PVIII présente les mutants du mimotope 2C8(11). La surinfection est effectuée lorsque la culture est en phase exponentielle (DO à 600nm de 0,25-0,4) et consiste en l'ajout d'une quantité de phage helper M13K07 tel qu'il y en ait vingt fois plus que de bactérie. Elle est suivie de l'induction par l'IPTG (1mM) de l'expression des PVIII recombinantes encodées par le pC89.

Les cultures sont incubées sous agitation durant une nuit à 37°C puis centrifugées à 4°C durant 30 minutes à 1500 RPM.

Les surnageants de phage sont conservés stérilement.

2.2.2. Expérience de Dot Blot

Le dot blot à l'avantage de permettre un criblage rapide des différents mutants. Il donne une indication qualitative sur l'importance de la reconnaissance des différents mutants par l'AcM 2C8.

Les surnageants de phage sont adsorbés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C, 0,45 Micron). Cette membrane est ensuite saturée puis incubée avec l'AcM 2C8. Après cinq lavages, un conjugué dirigé contre l'AcM 2C8 et marqué à la peroxidase est ajouté, et la membrane est révélée par chémoluminescence à l'aide des substrats du kit Lumi-Light Western-Blotting (Roche, protocole au paragraphe 7.2. de matériel et méthodes).

Pour pouvoir comparer entre elles les intensités des spots représentant chaque mutant, une seconde membrane, préparée exactement comme la première a été révélée avec un anticorps monoclonal anti-PVIII (Figure 30B). Cette seconde membrane nous permet de savoir s'il y a une quantité de phage adsorbé comparable pour chaque spot.

Les résultats donnés à la figure 30A montrent que les mutations ponctuelles en alanine des résidus aminés C⁶, I⁸, W⁹, C¹⁰, ont pour effet une perte de reconnaissance par l'AcM 2C8. La mutation ponctuelle du résidu D¹¹ montre également un signal plus faible, mais la figure 30 B montre qu'une moins grande quantité de phages était adsorbée. Pour confirmer la perte d'affinité du mutant D¹¹ une méthode plus quantitative telle que l'ELISA serait nécessaire. Les résidus C⁶, I⁸, W⁹, C¹⁰ et D¹¹ font tous partie du consensus strict établi à partir du phages qui ressemblent à 2C8 (11). Chacun d'entre eux semble être nécessaire pour la reconnaissance par l'AcM 2C8.

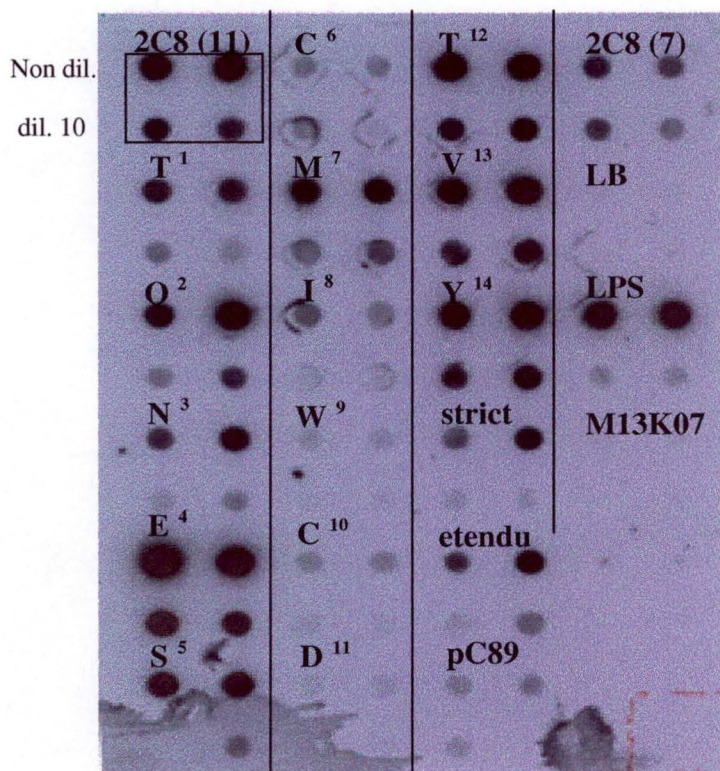


Figure 30A – Dot Blot.

Analyse qualitative de la reconnaissance par l'AcM 2C8 des peptides mutant du 2C8 (11) (alanine scanning et consensus).

Comme indiqué dans l'encadré noir, 100µl de surnageant de phage non dilué et dilué 10 fois ont été déposés en duplicat sur la membrane de nitrocellulose (Hybond).

De haut en bas et de gauche à droite nous avons le phage pC89/2C8(11) (considéré comme le sauvage), les 14 mutants de l'alanine scanning et le consensus strict et étendu. Viennent ensuite un contrôle négatif, le surnageant d'une culture transformée par le vecteur pC89 vide et surinfectée de la même manière que les autres échantillons. Le 2C8(7) est un contrôle positif (vérification que la méthode de préparation des phages fonctionne), il s'agit d'un autre phage reconnu par l'AcM 2C8. Le contrôle "LB" vérifie qu'il n'y a pas eu de contamination lors des cultures en format 96 puits. Le LPS (1µg/ml et 0,1µg/ml) utilisé provient de la souche W99, c'est un autre contrôle positif (contrôle de la reconnaissance de l'AcM). Le dernier échantillon comprend deux dilutions d'une préparation du phage helper (10^{12} part./ml et 10^{10} part./ml). Il ne porte pas de peptide et n'est donc pas reconnu par l'AcM 2C8.

On observe que le signal est fortement diminué pour les peptides qui portent une alanine à la place des résidus C⁶, I⁸, W⁹, C¹⁰ et D¹¹. Ce signal est équivalent à celui donné par le contrôle négatif pC89 sans insert. Les deux consensus stricts et étendus sont toujours reconnus par l'AcM mais dans une moindre mesure. Les mutants T¹, N³, S⁵ et M⁷ semblent également légèrement moins bien reconnus.

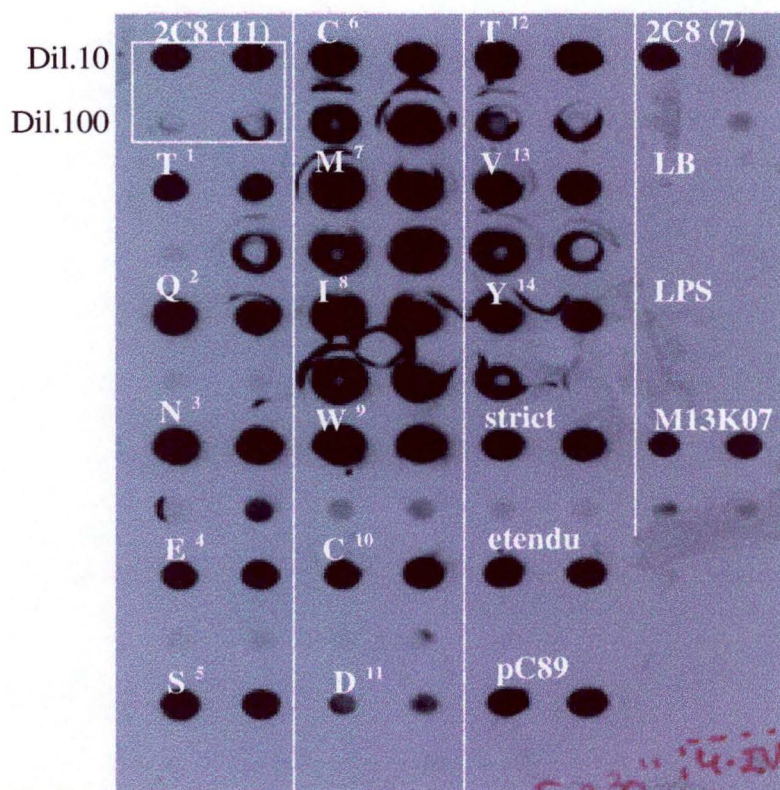


Figure 30 B Dot Blot.

Evaluation quantitative de la présence de phages. Détection avec l'AcM anti-PVIII.

Comme indiqué dans l'encadré, 100µl de surnageant de phage dilué 10 et 100 fois ont été déposés en duplicat sur la membrane de nitrocellulose (Hybond).

De haut en bas et de gauche à droite nous avons le phage pC89/2C8(11) (considéré comme le sauvage), les 14 mutants de l'alanine scanning et les consensus strict et étendu. Viennent ensuite un contrôle négatif du Dot Blot avec l'AcM 2C8: le surnageant d'une culture transformée par le vecteur pC89 vide et surinfectée de la même manière que les autres échantillons. Le 2C8(7) est un autre phage reconnu par l'AcM 2C8 et préparé de la même manière. Le contrôle "LB" vérifie qu'il n'y a pas eu de contamination lors des cultures en format 96 puits. Le LPS W99 sert de contrôle positif dans le Dot Blot avec l'AcM 2C8. Il n'est évidemment pas reconnu par l'AcM anti-PVIII. Le dernier échantillon donne deux dilutions d'une préparation du phage helper utilisé comme contrôle positif de la reconnaissance de phage par l'AcM anti-PVIII (10^{10} part./ml et 10^8 part./ml).

Tous les contrôles donnent un signal cohérent. La majorité des surnageants testés donne un signal quasi identique à celui du phage sauvage pC89/2C8(11). Les surnageants des mutant C⁶ et I⁸ donnent un signal plus intense que les autres mutants avec l'AcM anti-PVIII malgré qu'avec l'AcM 2C8 ces mêmes surnageants ne soient pas ou peu détectés. Ceci renforce l'idée que la perte d'affinité de ces mutants (voir texte) résulte bien du remplacement du résidu du consensus par une alanine. Le signal du mutant D¹¹ est plus faible que celui de la sauvage. Il faudra donc confirmer par un test plus quantitatif que la perte de reconnaissance de ce mutant par l'AcM 2C8 résulte bien du remplacement de l'aspartate par l'alanine et non d'un nombre de PVIII inférieur.

Les mutations ponctuelles sur les autres résidus n’ont pas d’effet détectable en Dot Blot sur la reconnaissance par l’AcM 2C8 (Figure 30A)

3. Analyse de consensus étendu et strict

Jusqu'à présent, il a été démontré que chacun des résidus du consensus dit "strict" étaient absolument nécessaires pour la liaison avec l'AcM 2C8. En créant un peptide ou les résidus du peptide ne faisant partie du consensus sont remplacés par des alanines nous pourrions savoir si les résidus du consensus sont suffisants pour interagir avec l'AcM 2C8. Deux peptides différents reprenant le consensus *sensus stricto* et le consensus dit "étendu" vont être produits. Le consensus strict reprend tous les acides aminés partagés par les quatre mimotopes 2C8 (3), (11), (12), (13). Le consensus étendu reprend ces mêmes résidus en y ajoutant ceux qui sont partagés par minimum deux des quatre peptides mimotopes.

2C8 (11)	TQN ESC M IWCD TVY
2C8 (12)	LVDRRCY IWCDG PE
2C8 (13)	GIS EPCL IWCDG NA
2C8 (3)	ESKH SCQ IWCD NML
Consensus strict	AAAAACA IWCD AAA
Consensus étendu	AAA ESCA IWCDG AA

Figure 31 – Séquences consensus et peptide mimotope 2C8 (11).

Les peptides mimotopes 2C8 (11), 2C8 (12), 2C8 (13), et 2C8 (3) présentent tous le consensus C-**IW CD** qui est appelé "consensus strict". L'ajout au consensus strict des résidus marqués en rose, donne lieu au consensus dit étendu dont la séquence est **ESC-
WCDG**.

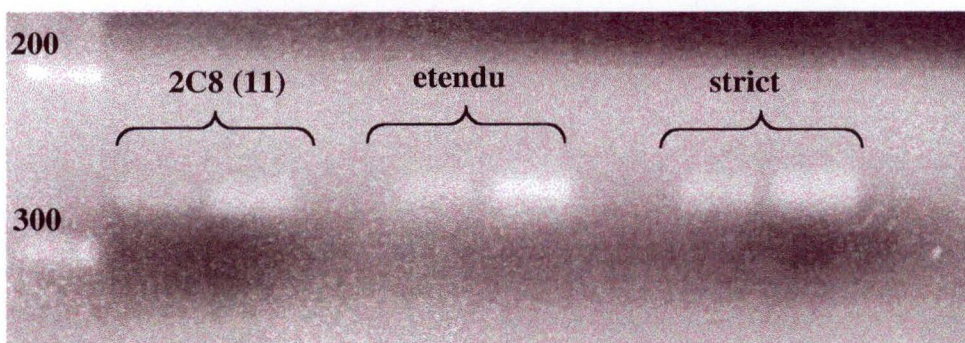


Figure 32 - Gel d'électrophorèse (1,5 % agarose)

Quantification des produits PCR 2C8(11), consensus étendu et consensus strict après la purification.

Pour chaque produit PCR, 1 μ l et 3 μ l (de gauche à droite), sont déposés dans les puits du gel. Le marqueur de taille se trouve dans le premier puits.

Par rapport à l'intensité des bandes du marqueur (Smart ladder SF, Eurogentec) la concentration des produits PCR "consensus étendu" est estimée à 40 ng/ μ l et pour "consensus strict" à 20 ng/ μ l.

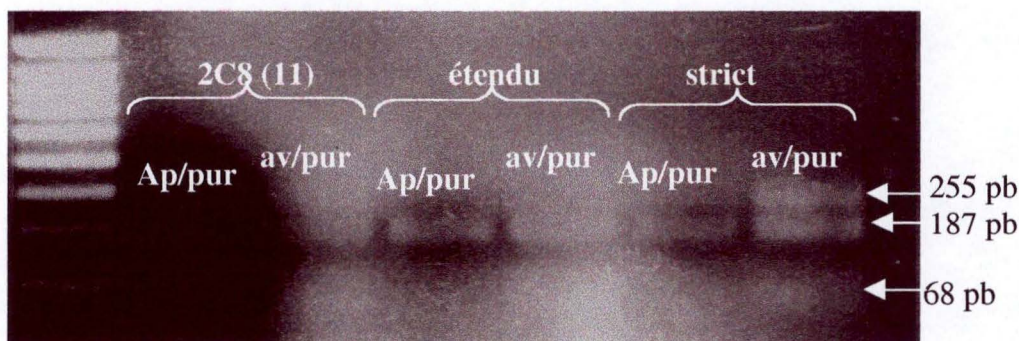


Figure 33- Gel d'électrophorèse (Agarose 1,5 %)

Vérification de la restriction *EcoRI/NheI* des produits PCR 2C8 (11), "consensus étendu" et "consensus strict".

Le marqueur de taille (Smart Leader SF, Eurogentec) se trouve dans le premier puits.

2 μ l de chaque produit PCR purifié après restriction et avant restriction (taille 255pb) ont été déposés respectivement. La restriction de ces produits PCR donne des fragments de 187pb, 68pb et 3pb (indétectable sur ce type de gel). C'est le fragment de 187pb qui sera ultérieurement cloné dans le pC89. Sa concentration est estimée à 20 ng/ μ l. La bande visible à 255 pb dans les échantillons post-restriction correspond à une restriction partielle minime.

3.1. Construction des phagemides pC89 exprimant le consensus étendu ou strict du mimotopes 2C8 (11)

3.1.1. Préparation de la matrice

Le vecteur pC89 est restreint aux sites *EcoRI* et *NheI* et un insert contenant la séquence codant pour le consensus strict ou le consensus étendu y est ensuite réintroduite. Le protocole suivi est le même que celui utilisé pour les constructions des mutants alanine scanning du mimotope 2C8 (11) (Figures 14 et 15).

3.1.2. Préparation de l'insert

L'insert est obtenu par PCR sur le pC89. Il est ensuite restreint par les enzymes *EcoRI* et *NheI* et cloné dans la matrice préparée comme indiqué ci-dessus.

Obtention et purification des fragments contenant la séquence des consensus étendu et strict par PCR:

Les amorces utilisées en amont pour les deux PCR porte le site de restriction *EcoRI* et soit la séquence du consensus étendu soit la séquence du consensus strict. L'amorce utilisée en aval (feli aval) s'hybride suffisamment loin dans la séquence du pC89 pour permettre de conserver le site *NheI* dans le fragment PCR. Le template utilisé est une minipréparation du pC89 dilué 100fois. (Schéma PCR, figure 16)

Le produit de l'amplification PCR est ensuite purifié sur une colonne (PCR purification kit, Gibco). La concentration de nos produits PCR "consensus strict", est estimée à 20 ng/ml. Pour le produit PCR "consensus étendu", la concentration est estimée à 40 ng/ml.(Fig 32).

Restriction et purification des inserts consensus étendu et strict :

Le protocole de restriction suivi est le même que celui employé pour obtenir l'insert 2C8 (11) dans le paragraphe 1.1.2. de "Résultats". La concentration des inserts restreints est estimée à 10ng/μl sur gel d'électrophorèse (agarose 1,5%) (Fig 33).

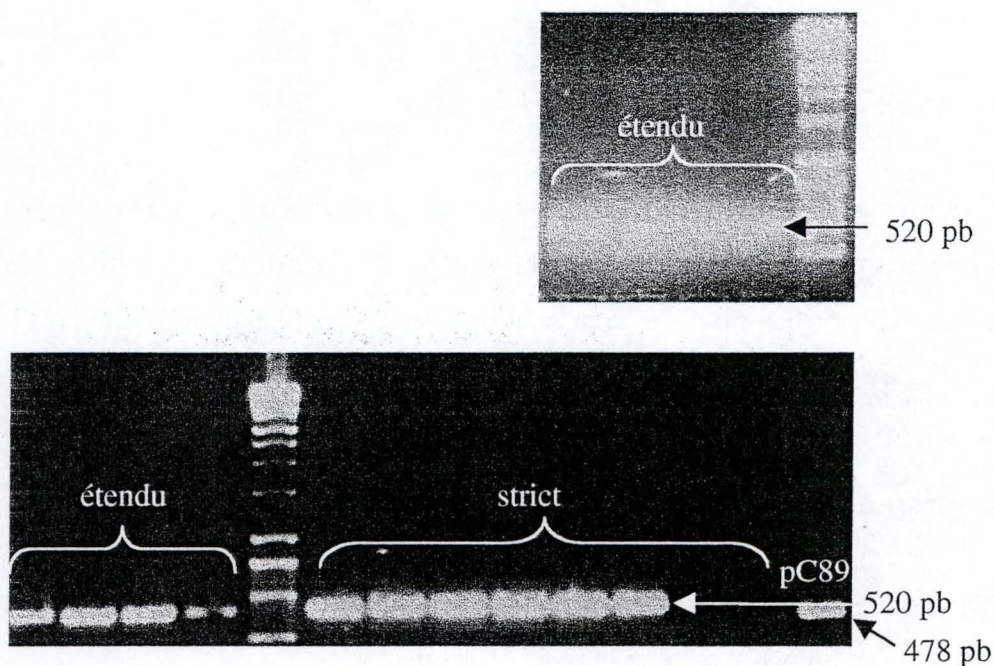


Figure 34 - Gel d'électrophorèse (Agarose 0,8 %)

PCR sur colonies transformées avec pC89/ETENDU et pC89/ STRICT.

Marqueur de taille utilisé:

Gel au-dessus, dernier puits, et gel au-dessous cinquième puits, hyperLadder (Biolines). L'amplicon utilisé comme contrôle de taille (PCR avec pC89 comme template) se trouve bien plus bas que tous nos échantillons. Tous les clones testés sont bien recombinants.

Pour chaque échantillon, 5 µl de produit de PCR sont déposés sur gel. La présence des inserts dans pC89 augmente la taille de l'amplicon à 520 pb. Toutes les PCR réalisées sur des colonies transformées avec pC89/étendu ont fonctionné. Pour les transformants pC89/strict, les 7^{ème} et 8^{ème} PCR n'ont donné aucune amplification. Pour chaque construction nous avons donc au moins un clone possédant l'insert désiré.

3.1.3. Ligation, Transformation et séquençage

Les protocoles de ligation et de transformation sont les mêmes que ceux décrits dans le point 1.1.3 du chapitre "Résultats".

Comme pour le séquençage du clone pC89/2C8(11), des amplifications PCR avec les amorces "feli amont" et "feli aval" ont été réalisées sur 8 colonies de chaque construction. Une PCR sur une minipreparation de pC89 sans insert est utilisée comme contrôle de taille et une PCR sans template a servi de contrôle négatif (Figure 34).

Les produits PCR de taille correcte sont purifiés sur colonne et séquencés. Au moins un clone pour chacun des consensus strict ou étendu avait une séquence correcte (paragraphe 1.1.4. de matériel et méthodes).

3.2. Test des consensus strict et étendu par rapport à 2C8 (11) pC89

L'interaction entre les phages provenant des deux constructions pC89/consensus strict et pC89/consensus étendu et l'AcM 2C8 va être testée en Dot Blot avec l'AcM 2C8.

3.2.1. Production de surnageant de phage

La technique employée pour obtenir les surnageant de phage du pC89/consensus strict et pC89/consensus étendu est la même que celle utilisée pour tester les mutants de l'Alanine Scanning (voir point 2.2.1. du chapitre "Résultats").

3.2.2. Expérience de Dot Blot

Comme précédemment, ces surnageants de phage sont adsorbés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C 0,45Micron). Cette membrane est ensuite saturée et incubée avec l'AcM 2C8. Après cinq lavages, le conjugué dirigé contre l'AcM 2C8 et marqué à la peroxidase est ajouté et la membrane est révélée par chémoluminescence à l'aide des substrats du kit Lumi-Light Western-Blotting de Roche (paragraphe 7.2. de matériel et méthodes).

La quantité de phages adsorbés est contrôlée comme lors de la première expérience, par incubation en duplicat de la membrane avec un anticorps monoclonal anti-PVIII (Figure 35B).

Les résultats du Dot Blot avec l'anticorps monoclonal 2C8 (Figure 35A) montrent que les peptides "consensus étendu" et "strict" sont reconnus par l'AcM 2C8, presque aussi bien que le peptide 2C8(11) sauvage.

Tous les résidus consensus strict sont donc non seulement nécessaires mais également suffisants pour la reconnaissance par l'AcM 2C8. Néanmoins, on peut remarquer que l'intensité des spots obtenus pour le "consensus étendu" semble plus forte. Bien que le consensus strict soit le mimotope minimal, l'ajout des résidus du consensus étendu en augmente probablement l'affinité. Pour confirmer ces résultats, des tests plus quantitatifs (ELISA ou biacore par exemple) devront être réalisés.

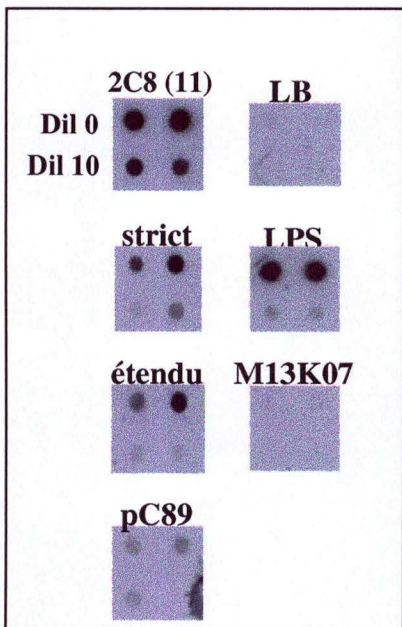


Figure 35 A-Dot Blot (AcM 2C8), reprise de la figure 30 A
Analyse qualitative de la reconnaissance par l'AcM 2C8 des peptides mutant du 2C8 (11) consensus.

Comme indiqué dans l'encadré, 100µl de surnageant de phage non dilué et dilué 10 fois ont été déposés en duplicat sur la membrane de nitrocellulose (Hybond).

Un contrôle négatif, le surnageant d'une culture transformée par le vecteur pC89 vide et surinfectée de la même manière que les autres échantillons.

Le contrôle "LB" vérifie qu'il n'y a pas eu de contamination lors des cultures en format 96 puits. Le LPS (1µg/ml et 0,1µg/ml) utilisé provient de la souche W99, c'est un autre contrôle positif (contrôle de la reconnaissance de l'AcM). Le dernier échantillon comprend deux dilutions d'une préparation du phage helper (10^{12} part./ml et 10^{10} part./ml). Il ne porte pas de peptide et n'est donc pas reconnu par l'AcM 2C8.

Les deux consensus stricts et étendus sont toujours reconnus par l'AcM mais dans une moindre mesure.

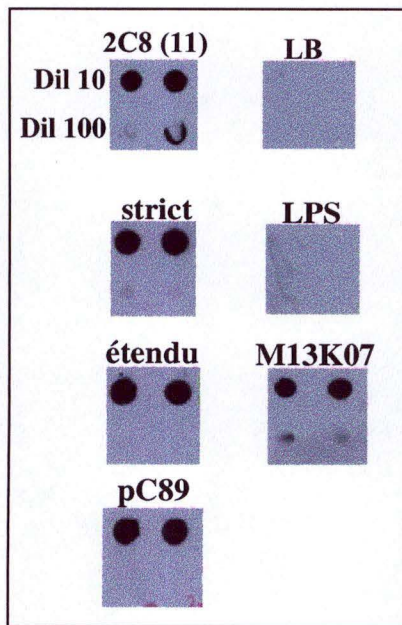


Figure 35 B-Dot Blot (AcM antiPVIII), reprise de la figure 30 B
Evaluation quantitative de la présence de phages. Détection avec l'AcM anti-PVIII

Comme indiqué dans l'encadré, 100µl de surnageant de phage dilué 10 et 100 fois ont été déposés en duplicat sur la membrane de nitrocellulose (Hybond).

Le contrôle "LB" vérifie qu'il n'y a pas eu de contamination lors des cultures en format 96 puits. Le LPS W99 sert de contrôle positif dans le Dot Blot avec l'AcM 2C8. Il n'est évidemment pas reconnu par l'AcM anti-PVIII. Le dernier échantillon donne deux dilutions d'une préparation du phage helper utilisé comme contrôle positif de la reconnaissance de phage par l'AcM anti-PVIII (10^{10} part./ml et 10^8 part./ml).

Tous les contrôles donnent un signal cohérent.

La majorité des surnageants testés donne un signal quasi identique à celui du phage sauvage pc89/2C8(11)

DISCUSSION , CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude du mimotope 2C8(11) et du consensus qu'il porte nous amène à tirer plusieurs conclusions sur la nature de l'interaction qu'il a avec l'AcM 2C8. Premièrement, nous pouvons affirmer que les acides aminés adjacents (soulignés ci-dessous) au mimotope 2C8(11) ne jouent pas un rôle essentiel dans la reconnaissance par l'AcM 2C8. Que le mimotope 2C8(11) soit présenté dans un système phage F88 ou phagemide F8+8, il est toujours aussi bien reconnu par l'AcM.

2C8 (11) f88-4: ATQNESCMIWCDTVYPAEGDDPAKA.. (PVIII)

2C8 (11) pC89: AEGEFTQNESCMIWCDTVYGDPAKA... (PVIII)

Les résultats de l'alanine scanning montrent que des mutations dans les acides aminés ne faisant pas partie du consensus strict ne provoquent pas de perte d'affinité remarquable pour l'AcM 2C8. Des méthodes quantitatives plus sensibles devraient être utilisées pour confirmer ces résultats et analyser plus finement des petits changements d'affinité pouvant résulter des mutations en alanine, surtout pour les résidus ne faisant pas partie du consensus strict.

Les mutations ponctuelles en alanine de chacun des résidus du consensus strict (**C X I W C D**) abolissent la reconnaissance par l'AcM 2C8. Chacun de ces résidus est donc essentiel à la reconnaissance par l'AcM 2C8 mais probablement pas de la même façon. Les deux résidus cystéines (qui étaient fixés dans la banque aléatoire d'où proviennent les mimotopes possédant ce consensus) jouent certainement un rôle de structuration du peptide en permettant d'adopter une forme de boucle jointe par un pont disulfure. Des expériences faites en milieu réducteur (DTT 0,01mM) montrent que pour pC89/2C8(11) que lorsque le pont disulfure n'est pas présent, l'interaction avec l'AcM 2C8 est très faible (Graphe, figure 36). Le remplacement de l'une ou l'autre des cystéines par une alanine élimine de la même façon le pont disulfure. Le peptide n'est donc plus présenté sous forme de boucle et la reconnaissance ne se fait plus. Il est également intéressant de noter que les quatre mimotopes reconnus par l'AcM 2C8 ont

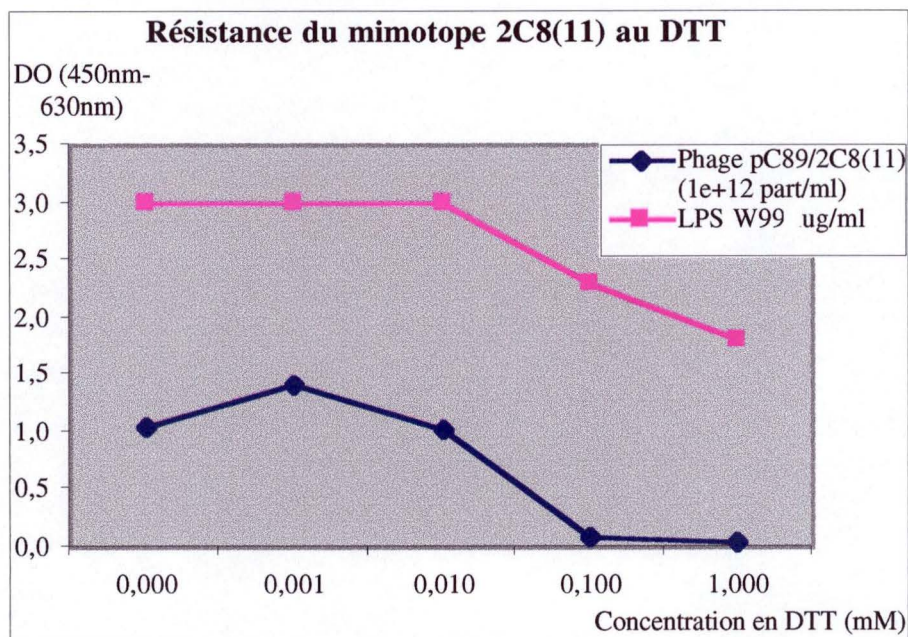


Figure 36- Test de l'influence du DTT sur la reconnaissance du pC89/2C8(11) par l'AcM2C8.

Pour différencier l'activité du DTT sur les ponts disulfure de l'AcM 2C8 et sur le pont disulfure du peptide 2C8(11), un contrôle avec du LPS W99 (insensible au DTT) a été testé en même temps que le mimotope.

Lorsque la concentration en DTT atteint 0,1 mM, l'interaction entre l'AcM 2C8 et le mimotope 2C8(11) est totalement abolie. A cette même concentration, l'interaction entre l'AcM 2C8 et le LPS W99 se fait toujours (bien que légèrement diminuée).

Nous pouvons donc conclure qu'à cette concentration, le pont disulfure du mimotope 2C8(11) est rompu ce qui diminuerait drastiquement sa reconnaissance par l'AcM 2C8.

tous trois résidus entre les cystéines de la boucle. Les cystéines définissent probablement la conformation de la structure du mimotope lors de la reconnaissance.

Les résidus isoleucine, aspartate et tryptophane interagissent probablement plus directement avec les acides aminés du paratope. D'après les modèles 3D construits au laboratoire par Thierry Laurent (thèse en cours) le paratope de l'AcM 2C8 est formé d'une crevasse étroite dont les parois et l'une des extrémités sont formés par des résidus aromatiques et l'autre extrémité par un résidu arginine (images, figures 37 et 38). Nous pouvons donc prédire que le tryptophane conservé dans le consensus de nos mimotopes interagit avec les résidus aromatiques du paratope de l'AcM 2C8 (interaction hydrophobe, interaction de stacking...). L'aspartate du consensus pourrait également faire une interaction ionique pour interagir avec l'arginine du paratope. L'isoleucine est plus difficile à positionner car elle ne possède aucun groupement réactionnel. Seule sa taille, la rendant plus hydrophobe et plus volumineuse la différencie de l'alanine. Elle n'en reste cependant pas moins nécessaire pour l'interaction. D'autres études de mutagenèse pourraient également préciser l'analyse de la structure mimotope du 2C8(11), par exemple en remplaçant l'aspartate en glutamate ou en asparagine (modification de la taille ou de la charge) ou le tryptophane par un autre résidu aromatique.

Les constructions de mutants ne possédant que le consensus strict ou étendu ont montré ensuite que non seulement chaque acide aminé du consensus était nécessaire pour l'interaction avec l'AcM 2C8 mais qu'en plus le consensus strict seul était suffisant pour être reconnu. Nous pensons cependant que bien que le consensus strict seul donne un signal positif en dot blot, son affinité est probablement plus faible que celle du consensus étendu ou du mimotope complet mais ceci devra être confirmé dans le futur par des techniques quantitatives.

L'étude de consensus par mutagenèse tel qu'elle a été développée ici nous a donc permis d'augmenter nos connaissances sur les interactions entre le mimotope 2C8(11) et l'AcM 2C8.

De nombreux mimotopes de la chaîne O du LPS de *Brucella* sont de bons compétiteurs de l'antigène mais de pauvres immunogènes contre la structure mimée. Nos résultats apportent des hypothèses quand à ce manque de mimétisme immunogénique. Premièrement, bien que les mimotopes de la famille du 2C8(11) soient capables d'inhiber l'interaction entre le LPS et l'AcM 2C8, il est peu probable, de par la taille de leur partie

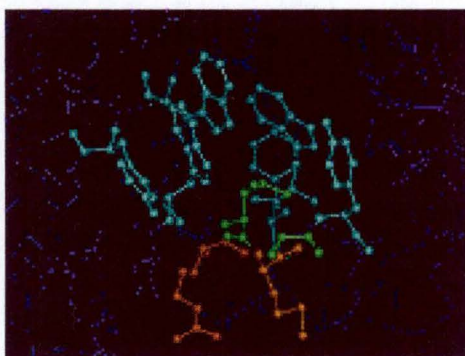


Figure 37: vue "du dessus" du paratope de l'AcM 2C8.

Les résidus aromatiques sont colorés en bleu cyan, les résidus hydrophobes en vert, les résidus polaires en orange et l'arginine en rouge.

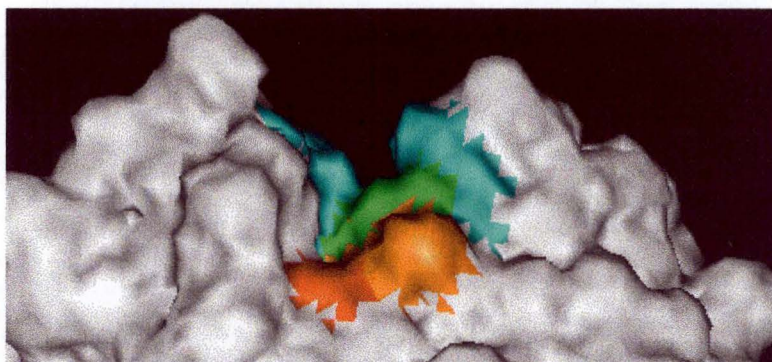


Figure 38 : vue de profil du paratope de l'AcM 2C8.

La crevasse formée par les CDR est étroite et formée principalement par les résidus aromatiques. L'arginine est présentée à l'avant plan (en rouge). Le code couleur est identique à celui de la figure 33.

mimante, qu'il fassent autant d'interaction que l'antigène. En effet, on sait qu'un épitope peptidique linéaire couvre environ 5 à 6 résidu, et ici seuls 3 résidus sont requis pour la liaison. Il est donc probable que 3 résidus ne suffisent pas à mimer correctement un épitope saccharidique. Deuxièmement, lorsque l'on immunise un animal avec ce mimotope, de nombreux anticorps sont produits mais parmi ceux-ci, il n'y en a qu'une fraction qui sont dirigé contre le consensus. Et parmi tous ces anticorps dirigés contre le consensus, une partie reconnaît également d'autres acides aminés du mimotope qui ne sont pas idéaux pour former un anticorps anti-chaîne O. Ceci a pour conséquence que bien que ces mimotopes soient de bon compétiteurs et que le titre d'anticorps anti-mimotope obtenu en immunisation soit élevé, il y a très peu d'anticorps capables de cross-réagir avec le LPS.

Pour améliorer le mimétisme immunogénique des peptides qui présentent le consensus C⁶ X I⁸ W⁹ C¹⁰ D¹¹, des banques de seconde génération construites sur base de ce consensus mais en laissant les autres positions aléatoires devraient être construites. En augmentant le nombre de résidus du mimotope indispensable à la reconnaissance par l'AcM 2C8 nous espérons améliorer le mimétisme.

MATERIEL ET MÉTHODES

1. Technique d'obtention et d'amplification d'ADN double brin

1.1. Réaction de polymérisation d'ADN en chaîne (PCR)

La PCR (réaction de polymérisation d'ADN en chaîne) permet l'amplification de fragments d'ADN.

L'ADN est tout d'abord dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires de séquences se trouvant de part et d'autre de la région-cible à amplifier, s'hybrident à chacun des deux brins. Une ADN polymérase stable à haute température est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire au template.

Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting (T_m) des amorces. Une façon simple de calculer le T_m est la suivante : $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ où G est le nombre de bases guanines dans l'oligonucléotide.

L'efficacité du rendement et de la spécificité de la PCR dépend de nombreux paramètres : la concentration, la taille et la séquence des amorces, le type de tampon, la concentration de déoxynucléotides triphosphate (dNTP), le type de polymérase, les paramètres (temps et température) utilisés pour réaliser les cycles, ...

1.1.1. Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions pC89/2C8 (11), pC89/consensus étendu et pC89/consensus strict

♦ Séquences des amorces :

1. Amorces utilisées en amont pour les différentes PCR (le site de restriction *EcoRI* est souligné)

-2C8 (11):

GGTGAATTTCGCGGCAGCGGAGAGTTGTGCGATTTGGTGTGATG
GGGCGGCGGGGGATCCCGCAAAGCGGC (T_m 60°, 71 bases)

-Consensus strict:

GGTGAATTTCGCGGCAGCGGCAGCGTGTGCGATTTGGTGTGATGC
AGCGGCGGGGGATCCCGCAAAGCGGC (T_m 60°, 71 bases)

-Consensus étendu:

GGTGAATTTCGCGGCAGCGGAGAGTTGTGCGATTTGGTGTGATGG

GGCGGCGGGGATCCCGCAAAGCGGC (Tm 60°, 71 bases)

2. Amorce utilisée en aval pour les trois PCR :

Feli aval : TGCTGCAAGGCGATTAAGTT (Tm 58°, 20 bases)

♦ Réactifs :

-Volume total pour chaque PCR =	100 µl
-Amorce feli aval (Genset) (20uM)	1 µl
-Amorce 2C8(11) (Genset) (20uM)	} 1 µl
ou Cons. étendu (Genset) (20uM)	
ou Cons. strict (Genset) (20uM)	
-dNTP (Roche) (5mM, chacun)	4 µl
-Tampon de réaction 10X (Biotools, Spain)	10 µl
-H ₂ O mQ stérilisée par autoclavage	82,25 µl
-Taq polymerase (Biotools, Spain)	0,75 µl
-Template Maxiprep. pC89 (dilution 1:100)	1 µl

♦ Programme de PCR (Biozym PTC-150 minicycler) :

95°C 4 minutes	} 30 fois
95°C 30 secondes	
56°C 30 secondes	
72°C 40 secondes	
72°C 10 minutes	

1.1.2. Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions de l'Alanine Scanning de T(1) à M(7)

♦ Séquences des amorces :

♦ Amorces utilisées en amont pour les différentes PCR :

2C8(11) T1:

GGTGAATTCGCGCAGAATGAGAGTTGTATG

(Tm 58°, 30 bases)

2C8(11) Q2:

GGTGAATTCACGGCGAATGAGAGTTGTATGATTTGG

(Tm 60°, 36 bases)

2C8(11) N3:

GGTGAATTCACGCAGGCGGAGAGTTGTATGATTTGGTGT

(Tm 58°, 39 bases)

2C8(11) E4:

GGTGAATTCACGCAGAATGCGAGTTGTATGATTTGGTGTGA

(Tm 58°, 41 bases)

2C8(11) S5:

GGTGAATTCACGCAGAATGAGGCGTGTATGATTTGGTGTGATACGG

(Tm 62°, 46 bases)

2C8(11) C6:

GGTGAATTCACGCAGAATGAGAGTGCGATGATTTGGTGTGATACGGTTT

(Tm 60°, 49 bases)

2C8(11)M7:

GGTGAATTCACGCAGAATGAGAGTTGTGCGATTTGGTGTGATACGGTTTAT

(Tm 60°, 51 bases)

- ♦ Amorce utilisée en aval pour les amplifications par PCR : Feli aval

- ♦ Réactifs :

-Volume total pour chaque PCR =	100 µl
-Amorce feli aval (Genset) (20µM)	1,5 µl
-Diff. amorces amont (20µM)	1,5 µl
-dNTP (Roche) (5mM, chacun)	4 µl
-Tampon de réaction 10X (Biotools, Spain)	10 µl
-H ₂ O mQ stérilisée par autoclavage	80,5 µl
-Taq polymerase (Biotools, Spain)	1,5 µl
-Template pC89-2C8 (11) à 605ng/ml	2 µl

- ♦ Programme de PCR (Biozym PTC-150 minicycler) :

95°C 4 minutes	} 30 fois
95°C 30 secondes	
56°C 30 secondes	
72°C 40 secondes	
72°C 10 minutes	

1.1.3 Amplification par PCR des inserts utilisés pour les constructions de l'Alanine Scanning de I (8) à Y (14)

- ♦ Séquences des amorces :

- ♦ Amorce en amont pour toutes les PCR :

feli up-up : GCGGGCAGTGAGCGCAACGC (Tm 70°, 20 bases)

- ♦ Amorces en aval pour chaque PCR :

2C8(11)I8

GCGGGATCCCCATAAACCGTATCACACCACGCCATACAACCTCTCATTCTGCG

(Tm 58°, 52 bases)

2C8(11) W9

GCGGGATCCCCATAAACCGTATCACACGCAATCATAACAACCTCTCATTCTGC

(Tm 60°, 51 bases)

2C8(11) C10

GCGGGATCCCCATAAACCGTATCCGCCCAAATCATAACAACCTCTCATTC

(Tm 60°, 48 bases)

2C8(11) D11

GCGGGATCCCCATAAACCGTCGCACACCAAATCATAACAACCTCTC

(Tm 58°, 44 bases)

2C8(11) T12

GCGGGATCCCCATAAACCGCATCACACCAAATCATACTCT

(Tm 58°, 43 bases)

2C8(11) V13

GCGGGATCCCCATACGCCGTATCACACCAAATCATACAA

(Tm 56°, 39 bases)

2C8(11) Y14

GCGGGATCCCCCGCAACCGTATCACACCAAATCAT

(Tm 58°, 35 bases)

♦ Réactifs :

-Volume total pour chaque PCR =	100 µl
-Amorce feli up-up (Genset) (20µM)	1,5 µl
-Diff. amorces aval (20µM)	1,5 µl
-dNTP (Roche) (5mM, chacun)	4 µl
-Tampon de réaction 10X (Biotools, Spain)	10 µl
-H ₂ O mQ stérilisée par autoclavage	80,5 µl
-Taq polymerase (Biotools, Spain)	1,5 µl
-Template pC89-2C8 (11) à 605ng/ml	2 µl

♦ Programme de PCR (Biozym PTC-150 minicycler) :

95°C 4 minutes	} 30 fois
95°C 30 secondes	
56°C 30 secondes	
72°C 40 secondes	
72°C 10 minutes	

1.1.4. PCR sur colonies d'Escherichia coli DH11S contenant les constructions des phagemides pC89

♦ Séquences des amorces :

Feli aval : TGCTGCAAGGCGATTAAGTT (Tm 58°, 20 bases)

Feli amont : GCTATTCTAGAGATTACGCC (Tm 58°, 20 bases)

♦ Réactifs :

-Volume total pour chaque PCR =	50 µl
-Amorce feli aval (Genset) (20uM)	0,75 µl
-Amorce feli amont (Genset) (20uM)	0,75 µl
-dNTP (Roche) (5mM, chacun)	2 µl
-Tampon de réaction 10X (Biotools, Spain)	5 µl
-H ₂ O mQ stérilisée par autoclavage	40,75 µl
-Taq polymerase (Biotools, Spain)	0,75 µl
-Template : 1 colonie piquée avec un cure-dents ou 1 ul de pc89 (2 µg/ml dilué 500x -; ctrl. +)	

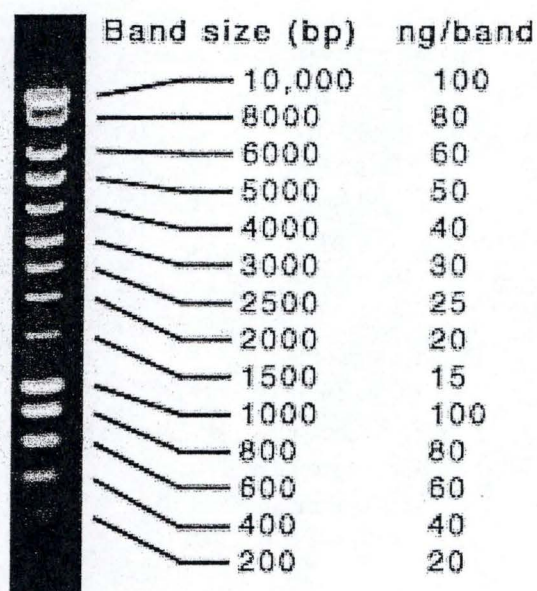


Figure 39 A -Marqueur de taille d'ADN quantitatif Hyper Ladder (Biolines) pour gel d'électrophorèse.

La première échelle représente les tailles des fragments du marqueur et la seconde leur quantité en ngr pour 5 µl de solution.

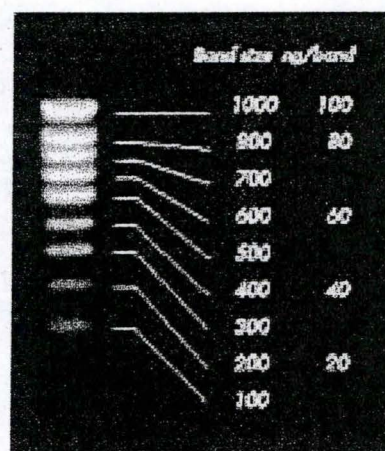


Figure 39 B- Marqueur de taille d'ADN quantitatif (Smart Ladder SF, Eurogentec) pour gel d'électrophorèse.

La première échelle représente les tailles des fragments du marqueur et la seconde leur quantité en ngr pour 5 µl de solution.

♦ Programme de PCR (Bio Rad icycler):

95°C 4 minutes	} 30 fois
95°C 30 secondes	
56°C 30 secondes	
72°C 40 secondes	
72°C 7 minutes	

2. Techniques d'analyses d'ADN

2.1. Electrophorèse

♦ Solution de coloration (valable pour les gels d'agarose et de polyacrylamide) et marqueurs :

1. Solution de coloration et d'alourdisseur 10x (pour 6ml) :

5 ml glycérol 100%
200 µl TAE 50X
200 µl SDS 1%
200 µl EDTA 0.5M
5 mg bleu de bromophénol
0.5 mg xylène de cyanol

2. Marqueurs pour gel d'agarose :

HyperLadder (Biolines), figure 39 A.
SmartLadder SF (Eurogentec), figure 39 B.

3. Marqueur pour gel de polyacrylamide (SDS-PAGE):

Kaleidoscope (BioRad), figure 40.

♦ Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes. Dans ce but, une différence de potentiel est appliquée au gel et l'ADN qui par ses groupements phosphates est chargé négativement, est alors attiré vers la borne positive. Les fragments de grande taille migreront moins vite car ils seront plus retenus par les mailles du gel.

L'agarose est un composé extrait d'algue marine. Il se dissout par chauffage et se redurcit ensuite en gel dont le degré de réticulation dépend de sa concentration initiale. En fonction de la taille des fragments à séparer on utilise différentes concentrations en agarose : plus la taille des fragments d'ADN est petite plus le pourcentage d'agarose doit être élevé.

La concentration approximative ainsi que la taille des fragments qui migrent sont alors évaluées grâce à la co-migration de marqueurs contenant une série de fragments de tailles variables mais connues. En comparant la distance de migration de bandes de l'ADN testé avec le marqueur, on peut en déduire la taille.

Pour la révélation du gel on utilise une molécule fluorescente, le bromure d'éthidium, qui est capable de se lier à l'ADN bicaténaire (et monocaténaire, mais avec une moindre affinité). Suite à l'illumination du gel avec des rayons U.V. ($\lambda=302\text{nm}$) ces molécules vont être excitées et vont émettre

Protéine	Couleur	Polypeptide Standard (KDa)
Carbonic anhydrase	Violet	38.6
Soybean trypsin inhibitor	Orange	25.0
Lysozyme	Rouge	16.3
Aprotinin	Bleu	7.8
Insuline	Bleu	3.4

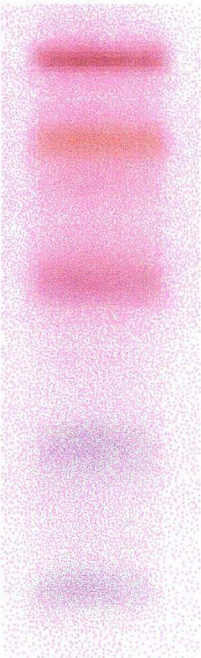


Figure 40 - **Marqueur Kaléidoscope (Bio Rad)**
 Nom, coloration et masse moléculaire des protéines du marqueur de taille Kaléidoscope (Bio Rad).

une lumière fluorescente. L'intensité de cette émission est proportionnelle à la quantité de bromure présent sur l'ADN et donc à la quantité ainsi qu'à la taille du fragment. On peut estimer la quantité d'ADN présent dans les bandes de gel de l'ADN testé en comparant leur intensité de fluorescence avec celle des bandes du marqueur dont les tailles exactes et les concentrations en fragments sont connues.

Réactifs et tampons:

1. Tampon d'électrophorèse TAE 50x (pour un litre):

- 242 g Tris/HCl
- 57,1 g d'acide acétique glacial (VEL)
- 100 ml d'une solution de $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ 0,5 M à pH 8,0.

2. Agarose:

- Agarose (Boehringer Mannheim, Germany)
- Température de fusion : 86°
- La concentration en agarose est fonction de la taille des fragments à analyser. En pratique :
 - pour le marqueur Hyper Ladder (Biolines) : 0,8 \Rightarrow 1,5 %
 - pour le marqueur SmartLadder SF(Eurogentec) : 1,5 \Rightarrow 2 %

Protocole utilisé:

1. Préparation de l'ADN à analyser. Ajouter 1 volume de solution de coloration et d'alourdisseur à 9 volumes de solution contenant l'ADN.
2. Préparation du gel
 - a) Dissoudre l'agarose (Boehringer Mannheim) par ébullition dans le TAE 1x.
 - b) Placer les peignes dans la cuve.
 - c) Couler l'agarose dans la cuve quand la solution a refroidi à environ 50°C, ajouter 2 μl de bromure d'éthidium (stock à 2 mg/ml) par 50 ml de gel.
 - d) Laisser le gel se solidifier au moins 20 minutes.
 - e) Retirer les peignes et placer le gel dans la cuve et le recouvrir de TAE 1x.
3. Déposer les échantillons préparés dans les puits
4. Migrer avec une différence de potentiel de 2,5 à 5 Volts/cm pendant une à deux heures.
5. Visualiser sur table UV.

♦ Gel d'électrophorèse de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE):

L'électrophorèse permet de séparer un mélange de protéines de tailles différentes. Dans ce but, les protéines sont dénaturées puis uniformément chargées grâce au SDS et une différence de potentiel leur est appliquée. La réticulation des gels de polyacrylamide est provoquée par la polymérisation de l'acrylamide en longues chaînes liées entre elles par des molécules bi-fonctionnelles : le méthylène-bis-acrylamide. Cette réaction est catalysée par le N, N, N', N', tetraméthyl-éthylendiamin (temed) et le persulfate d'ammonium.

Réactif et tampon :

Tampon de migration (par litre) : 17.9 g de tricine, 12.1 g de Tris base, 1 g de SDS.

Tampon de charge (2X) : 2 ml de dodecyl sulfate de sodium (10%), 1 ml glycérol, 170 μl de tampon Tris 1M, pH 6.8, 1.63 ml d' H_2O bi-distillée, 200 μl de Bleu de bromophénol et 150 mg dithiothreitol.

Préparation du gel de polyacrylamide :

	gel de résolution	Stacking gel
Acrylamide (49.5 % acrylamide et 0.5 % bisacrylamide)	7.5 ml	1 ml
H ₂ O distillée	3.4 ml	6.8 ml
Tris-HCl Buffer 3M, pH 8,3	7.5 ml	2.5 ml
Glycérol	4.2 ml	-----
10 % dodecyl sulfate de sodium	200 µl	75 µl
10 % persulfate d'ammonium	100 µl	50 µl
TEMED (N, N, N', N', tetraméthyl-éthylendiamin)	10 µl	10 µl

Migration et coloration à l'argent :

- Mélanger 10 µl de préparation de phages ($2,25 \times 10^{11}$ part./ml) avec 10µl de tampon de charge et dénaturer à 100° pendant 5 minutes.
- Charger l'échantillon et faire migrer les protéines dans une différence de potentiel de 130 volts. La migration se fait à 4°C et prend 12 à 18 heures.
- Coloration à l'argent (kit de coloration silver Staining Plus de Bio-Rad) :
 - Etape de fixation :
 - Préparation de la solution de fixateur (fixative Enhancer) :

Méthanol (Reagent Grade, Bio-Rad)	200 ml	50 % v/v
Acide Acétique (Reagent Grade Bio-Rad)	40 ml	10 % v/v
Fixateur concentré (Bio-Rad)	40 ml	10 % v/v
H ₂ O distillée	120 ml	30 % v/v
Total	400 ml	100 % v/v
 - Mettre le gel de polyacrylamide dans la solution "Fixative Enhancer", et agiter durant 20 minutes.
 - Lavage : Décarter la solution de fixation des protéines (Fixative Enhancer) et rincer deux fois avec 400 ml d'H₂O désionisée durant 10 minutes.
 - Coloration et développement :
 - Préparation de la solution de coloration (Staining Solution). Diluer dans 35 ml d'H₂O désionisée les réactifs suivants :
 - 5 ml de solution d'argent (Silver Complex, Bio-Rad)
 - 5 ml Solution de réduction (Reduction Moderator, Bio-Rad)
 - 5 ml de solution de développement (Image Development Reagent, Bio-Rad)
 - 50 ml de solution accélératrice de développement (Development Accelerator)
 - Arrêter la réaction de coloration avec une solution d'acide acétique 5 % (400 ml), durant un minimum de 15 minutes. Rincer le gel de polyacrylamide avec de l'H₂O mQ (400 ml), durant 5 minutes.
- Le gel de polyacrylamide peut être conservé à long terme dans un double feuillet de cellophane (Owl Separation Systems). Il est alors incubé avec une solution d'eau contenant 30 % de méthanol, 30 % de glycérol et séché à 80 °C pendant 1 heure.

2.2. Spectrophotométrie

L'ADN possède un maximum d'absorption à 260 nm. Pour connaître sa concentration, il suffit donc de mesurer l'absorbance d'une solution purifiée d'ADN à cette longueur d'onde et de connaître son coefficient d'extinction molaire (ϵ).

$$C = \epsilon / A$$

C = concentration en M/litre.

ϵ = coeff. Extinction molaire

A = absorbance

En pratique on calibre tout d'abord le spectrophotomètre avec le tampon dans lequel l'ADN se trouve. Une première mesure est effectuée à 260 nm comme référence. L'absorbance du tampon est ensuite mesurée à 280 nm.

Une fois le spectrophotomètre calibré par la référence du tampon, l'absorbance de l'échantillon d'ADN est mesurée à 260 nm et à 280 nm.

La valeur de l'absorbance nous donne une idée de la concentration alors que le rapport de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm nous donne aussi une estimation de la pureté de l'échantillon. Un rapport de 1.6 correspond à une courbe typique d'absorbance de l'ADN. Si le rapport s'éloigne de 1.6 c'est que la solution est contaminée par une molécule possédant un spectre d'absorbance différent.

2.3. Séquençage d'ADN

C'est le séquençage "automatique" qui a été utilisé pour ce travail. Le mélange de séquençage est constitué de l'ADN, de la polymérase, des quatre déoxyribonucléotides (dNTP) non-marqués et des quatre didéoxyribonucléotides (ddNTP) couplés à un marqueur fluorescent différent. Ces derniers stoppent la polymérisation lorsqu'ils sont insérés dans le brin complémentaire naissant et indiquent la nature de la dernière base insérée grâce au marqueur. Après polymérisation, le mélange est déposé sur un gel de polyacrylamide. A la fin du gel d'électrophorèse un faisceau lumineux frappe les fragments de tailles croissantes sortant et excite la molécule fluorescente couplée aux didéoxyribonucléotides. Un dispositif récepteur analyse le type de fluorescence émise et détermine donc la suite des nucléotides sur la séquence. Une seule piste est utilisée pour chaque séquençage automatique.

La réaction de séquençage se fait par PCR au moyen du kit "ABI PRISMTM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" pour séquenceur automatique ABI Prism (Perkin Elmer).

Le séquençage est réalisé sur séquenceur automatique « 377 DNA Sequencer ABI Prism (Perkin Elmer) », au laboratoire de Neurophysiologie et Physiopathologie.

Réactifs :

1. Amorce feli seq : 5'-ACGCTTTAGAAGTGAAT-3'

2. « Terminator Ready Reaction Mix » :
 - « A-Dye Terminator » marqué avec dichloro R6G
 - « G-Dye Terminator » marqué avec dichloro R110
 - « C-Dye Terminator » marqué avec dichloro TAMRA
 - « T-Dye Terminator » marqué avec dichloro ROX
3. déoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dITP, dTTP)
4. Amplitaq DNA Polymerase, FS, avec pyrophosphatase thermostable.
5. MgCl₂
6. Tampon Tris-HCl pH 9.0

Protocole :

1. Mix :

a) SEQUENCAGE DES PRODUITS DE PCR SUR COLONIE :

Produit de PCR purifié (< 20 ng/μl)	2 μl
Feli seq (1.6 μM) (Geneset)	2 μl
"Terminator Ready reaction mix"	2 μl
H ₂ O mQ stérile	8 μl

b) SEQUENCAGE À PARTIR DE PHAGEMIDE EXTRAIT DE COLONIES RECOMBINANTES:

Préparation de phagemide	}	2 μl
pC89-insert purifié (150 ng/μl)		
Feli seq (1.6 μM) (Geneset)		2 μl
"Terminator Ready reaction mix"		2 μl
H ₂ O mQ stérile		8 μl

2. Programme :

10 sec. à 96°C (dénaturation)	}	25 X
10 sec. à 50°C (hybridation)		
4 min. à 60°C (élongation)		

3. Technique de purification de l'ADN

3.1. Extraction au phénol

3.1.1. Purification des produits de PCR des inserts utilisés pour les constructions dans PC89

La purification de produits de PCR permet d'éliminer le tampon de réaction, les enzymes, les dNTP et les amorces qui ont été utilisées dans la réaction de PCR et qui pourraient entraver les réaction de ligation ou de restriction.

Protocole :

1. Dénaturation et élimination des protéines (Polymérase à ADN biotools) :
 - a) Centrifuger les eppendorf "Phase-lock" (Phase Lock Gel™ Light 1,5 ml, Germany) à 13000 rpm pendant 3 minutes pour culoter la matrice de gel avant usage.
 - b) Mélanger vigoureusement 95 µl de PCR (5 µl sont gardés pour évaluer le rendement de la purification) avec un volume identique d'une solution de phenol- chloroforme- alcohol isoamylique (Raport 1/1/0,015) dans l'eppendorf "phase lock".
 - c) Centrifuger à 13000 rpm durant 5 minutes et récupérer la phase aqueuse dans un nouvel eppendorf propre.
2. Précipitation de l'ADN et élimination des sels, des dNTP et des amorces :
 - a) Ajouter au 95 µl de produit PCR, 9.5 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,5 et 250 µl de l'éthanol 100 % glacé .
 - b) Mélanger et laisser à -80 °C pendant 30 minutes.
 - c) Centrifuger à 4 °C et 13000 rpm pendant 10 minutes.
 - d) Eliminer **délicatement** le surnageant et ajouter au culot 500 µl d'éthanol 70 % glacé.
 - e) Centrifuger à 4 °C et 13000 rpm pendant 5 minutes.
 - f) Eliminer **délicatement** le surnageant et sécher le culot avant de le resuspendre dans un volume choisi d'H₂O.

Après la purification, la concentration du produit de PCR est vérifiée sur un gel analytique d'électrophorèse (agarose 1.5 %, voir paragraphe 2.1. de matériel et méthodes).

3.2. Purification des produits PCR utilisés des constructions dans pC89 et des PCR sur colonies

La purification de produits de PCR permet d'éliminer le tampon de réaction, les enzymes , les dNTP et les amorces qui ont été utilisés dans la réaction de PCR et qui pourraient entraver les réaction de ligation ou de restriction.

Protocole de purification de produit PCR du kit Geneclan Turbo :

Le kit utilise le principe d'échange d'ions pour purifier l'ADN.

1. Ajouter au 45 µl de produit de PCR, 5 volumes de tampon Geneclan *Turbo* Salt Solution et mélanger.
2. Transférer le mélange dans la colonne de purification.
3. Centrifuger à 14000 rpm pendant 2 minutes, et éliminer le filtrat.
4. Ajouter 500 µl de tampon de lavage Geneclan *Turbo* Wash au milieu du filtre.
5. Centrifuger 5 secondes et éliminer le filtrat
6. Répéter ce lavage une seconde fois.
7. Centrifuger une dernière fois pendant 4 minutes pour éliminer toutes les traces de tampon de lavage.
8. Ajouter 30 µl de tampon d'élution Geneclan *Turbo* Elution Solution au milieu de la membrane et laisser à température ambiante pendant 5 minutes.
9. Centrifuger 30 secondes et récupérer l'ADN élué dans un nouveau tube.

Après la purification, la concentration du produit de PCR est vérifiée sur un gel analytique d'électrophorèse (agarose 1.5 %, paragraphe 2.1. de matériel et méthodes).

3.3. Extraction de l'ADN à partir de gel

Cette technique va permettre d'extraire la bande d'ADN intéressante à partir du gel de polyacrylamide ou d'agarose dans lequel il a migré. Dans un premier temps le gel est préparé et les échantillons sont chargés dans les pistes. Après migration et trempage dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est révélé une fraction de seconde sur le banc U.V.. Cette brève révélation permet de repérer la localisation de la bande d'ADN d'intérêt. Cette bande est alors découpée du gel et l'ADN en est extrait. Cette technique est utilisée pour éliminer les enzymes de restriction, de ligation, ou autres. Elle permet également de se débarrasser des fragments de restriction inutiles ou partiellement restreints.

Réactifs : Le kit « Geneclean III » (Q-biogene) a été utilisé pour ce type d'extraction.

Protocole :

1. Exciser le plus petit morceau possible de gel contenant la bande d'ADN avec une lame de scalpel propre.
2. Ajouter 3 vol. de solution de Iodure de Sodium (NaI) à ce morceau de gel (100mg gel = 100µl) et incubé environ 5 minutes à 55°, en mélangeant toutes les 2 minutes et jusqu'à ce que l'agarose soit dissous.
3. Ajouter l'enzyme Glassmilk (Avant utilisation homogénéiser la silice à l'aide du vortex, pendant 4 minutes), selon le volume de l'échantillon (10 µl d'enzyme Glassmilk ajouter si le volume d'échantillon est entre 500-1000µl), bien homogénéiser la silica et incubé durant 15 minutes.
4. Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 secondes. Éliminer le surnageant.
5. Précipiter l'ADN
 - a) Ajouter 10-50 volumes (200-700 µl convient) de la solution New Wash (contenant de l'éthanol)
 - b) Bien resuspendre par pipetage.
 - c) Centrifugation à 13000 rpm durant 5 secondes.
 - d) Éliminer le surnageant et répéter cette étape encore deux fois.
6. Sécher le culot (c'est nécessaire pour éliminer l'éthanol qui peut interférer sur les réactions de ligation et de séquençage). Laisser à température ambiante à proximité de la flamme du bec Bunsen durant 5 à 10 minutes.
7. Eluer l'ADN
 - a) Resuspendre le culot avec la solution d'élution (Elution Solution), un volume égal au volume ajouté de Glassmilk.
 - b) Centrifugation à 13000 rpm pendant 30 secondes.
 - c) Prendre **délicatement** l'ADN élué et le placer dans un nouvel eppendorf.
8. Deuxième resuspension du culot avec 5 µl de solution d'élution (pour récupérer 90-95 % de l'ADN)
9. Centrifuger à 13000 rpm pendant 30 secondes.

10. Récupérer l'ADN élué.

4. Techniques diverses relatives à l'ADN

4.1. Restriction

Les enzymes de restriction sont des enzymes capables de couper l'ADN double brin et qui sont produits de façon naturelle par certaines bactéries.

Nos expériences ont requis l'utilisation des enzymes de restriction suivantes :

Enzyme	Séquence
<i>Eco</i> RI	G↓AATT C C TTAA↑G
<i>Nhe</i> I	G↓CTAG C C GATC↑G
<i>Bam</i> HI	G↓GATC C C CTAG↑G
<i>Xba</i> I	T↓CTAG A A GATC↑T

Les unités enzymatiques sont définies comme la quantité d'enzyme nécessaire pour digérer complètement 1 µg de DNA après 60 minutes à la température optimale d'activité de l'enzyme.

Pour calculer le nombre d'unités enzymatiques nécessaires pour digérer un fragment d'ADN possédant une certaine de taille et un certain nombre de sites de restriction, on fait habituellement le rapport avec l'activité de la même enzyme sur le phage Lambda (voir ci-dessous pour les calculs).

FORMULE DU CALCUL UN NOMBRE D'UNITE ENZYMATIQUE (NU)
POUR RESTREINDRE UN FRAGMENT D'ADN :

NU = X*Y*50000/A*Z

Avec :

X= nombre de fois que coupe l'enzyme dans le fragment à restreindre

A= nombre de fois que l'enzyme coupe le génome du phage Lambda

Y= quantité d'ADN à restreindre en µg.

Z= taille du fragment à restreindre (en pb)

4.1.1. Restriction de pC89

a) *Eco*RI/*Nhe*I :

Quantité de matrice à utiliser :

1 clonage = 600 ng de matrice (*Eco*RI et *Nhe*I sont des sites uniques)

10 clonages *EcoRI/NheI* = 6 µg matrice.

Nombre d'unités d'enzyme à utiliser :

EcoRI : Nombre d'unités d'enzyme = $1/5 * 6/1 * 50000/3488 = 17,20$ unités

NheI : Nombre d'unités d'enzyme = $1/1 * 6/1 * 50000/3488 = 86$ unités

Réactifs et volumes :

<i>NheI</i> (Roche) (40 unités/µl)	3,8 µl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>EcoRI</i> (Roche) (40 unités/µl)	1 µl	
Tampon A (Roche) (10X)	5 µl	
Maxiprep de pC89 à 2 µg/µl	3 µl	
H ₂ O mQ stérile	37.2 µl	

Inactivation de l'enzyme : 65°C pendant 20 minutes.

b) *XbaI/BamHI* :

Quantité de matrice à utiliser :

1 clonage = 600 ng de matrice (*BamHI* et *XbaI* sont des sites uniques)

7 clonages *XbaI/BamHI* = 4,2 µg matrice.

Nombre d'unités d'enzyme à utiliser :

BamHI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/5 * 4,2/1 * 50000/3488 = 12,04$ unités

XbaI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/1 * 4,2/1 * 50000/3488 = 60,20$ unités

Réactifs et volumes :

<i>XbaI</i> (Roche) (40unités/µl)	13 µl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>BamHI</i> (Roche) (40unités/µl)	3 µl	
Tampon A (Roche) (10X)	13 µl	
Maxiprep de pC89 à 605 µg/ml	7 µl	
H ₂ O mQ stérile	83 µl	

Inactivation de l'enzyme : 80°C pendant 20 minutes.

4.1.2. Restriction des différents produits PCR purifiés

a) *EcoRI/NheI* :

a.1) Restriction des produits de PCR Alanine Scanning

- Quantité de produits à restreindre : Un clonage = 105 ng de produit PCR purifié

- Nombre d'unités enzymatiques :

EcoRI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/5 * 0,105/1 * 50000/255 = 4,11$ unités

NheI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/1 * 0,105/1 * 50000/255 = 20,58$ unités

- Réactifs et volume :

<i>NheI</i> (Roche) (40unités/μl)	2,5 μl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>EcoRI</i> (Roche) (10unités/μl)	2 μl	
Tampon A (Roche) (10X)	5 μl	
Produits PCR purifiés (10 ng/μl)	10.5 μl	
H ₂ O mQ stérile	30 μl	

- Inactivation de l'enzyme : 65°C pendant 20 minutes.

a.2) Restiction des produits de PCR pour la construction de pC89/2C8(11) et pC89/consensus strict :

- Quantité de produits à restreindre : Un clonage = 105 ng de produit PCR purifié

- Nombre d'unités enzymatiques :

EcoRI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/5 * 0,105/1 * 50000/255 = 4,11$ unités

NheI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/1 * 0,105/1 * 50000/255 = 20,58$ unités

- Réactifs et volume :

<i>NheI</i> (Roche) (10unités/μl)	2 μl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>EcoRI</i> (Roche) (10unités/μl)	1 μl	
Tampon A (Roche) (10X)	3 μl	
Produits PCR purifiés (7 ng/μl)	15 μl	
H ₂ O mQ stérile	9 μl	

- Inactivation de l'enzyme : 65°C pendant 20 minutes.

a.3) Produits de PCR pour la construction de pC89/consensus étendu :

- Quantité de produits à restreindre Un clonage = 200 ng de produit PCR purifié

- Nombre d'unités enzymatiques :

EcoRI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/5 * 0,2/1 * 50000/255 = 7,84$ unités

NheI: Nombre d'unités d'enzyme = $1/1 * 0,2/1 * 50000/255 = 39,21$ unités

- Réactifs et volume :

<i>NheI</i> (Roche) (10unités/μl)	4 μl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>EcoRI</i> (Roche) (10unités/μl)	1 μl	
Tampon A (Roche) (10X)	5 μl	
Produit PCR purifié (13,3 ng/μl)	15 μl	
H ₂ O mQ stérile	25 μl	

- Inactivation de l'enzyme : 65°C pendant 20 minutes.

b) XbaI/BamHI. Produits de PCR Alanine Scanning :

Quantité de produits à restreindre 1 clonage = 105 ng de produit PCR purifié

Nombre d'unités d'enzyme à utiliser :

*Bam*HI : Nombre d'unités d'enzyme= $1/5 * 0,105/1 * 50000/315 = 3,33$ unités

*Xba*I : Nombre d'unités d'enzyme= $1/1 * 0,105/1 * 50000/315 = 16,66$ unités

Réactifs et volumes :

<i>Xba</i> I (Roche) (40unités/μl)	2 μl	} Incubation de la restriction 2 heures à 37°C
<i>Bam</i> HI (Roche) (10unités/μl)	1,5 μl	
Tampon A (Roche) (10X)	13 μl	
Produits PCR purifiés (10 ng/μl)	10,5 μl	
H ₂ O mQ stérile	31 μl	

Inactivation de l'enzyme : 80°C pendant 20 minutes.

4.2. Ligation

La ligation consiste à catalyser la formation de la liaison phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité PO₄ 5' de deux fragments d'ADN. L'enzyme utilisée est l'ADN ligase du phage T4 à 1 u/μl.

4.2.1. Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés 2C8 (11), consensus étendu et consensus strict

5. Ligation de fragments possédant des extrémités protrudantes:

Pour que la ligation entre extrémités protrudants, nous avons choisi un rapport molaire insert/matrice de 5/1.

- Taille des fragments à liguer:

Insert : 187 pb

Matrice : 3343 pb

- Calcul du volume des réactifs :

Pour une ligation avec 100 ng de matrice on a besoin de :

$100 * 5/1 * 187/3343 = 27,96$ ng d'insert

d) Protocole de la ligation rapide (Rapid DNA Ligation Kit de Roche)

1. Mélanger les solutions contenant la matrice et l'insert dans du tampon de dilution (Buffer DNA Dilution) pour arriver au volume final de 10 μl.
2. Ajouter 10 μl de ligation (T4 DNA Ligation Buffer) et mélanger (vortex).
3. Ajouter 1 μl de ligase (T4 DNA Ligase) et mélanger (vortex).

La ligation est prête pour la transformation. Si l'utilisation n'est pas directe, on conserve le mélange entre -15 et -25 °C.

4.2.2. Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés des mutants Alanine T^1 , Q^2 , N^3 , E^4 , S^5 , C^6 , M^7

♦ Ligation de fragments possédant des extrémités protrudantes :

- Taille des fragments à lier:
 - Insert: 187 pb
 - Matrice: 3343 pb
- Calcul du volume des réactifs :
 - Pour une ligation avec 33,2 ng de matrice on a besoin de:
 - $33,2 \times 5/1 \times 187/3343 = 9,28$ ng d'insert

♦ Protocole :

1. Mélanger :

Produit de PCR (2 ng/μl)	12 μl
pC89 restreint <i>Eco</i> RI et <i>Nhe</i> I (16.6 ng/μl)	2 μl
Tampon de réaction (5X) (Gibco BRL, invitrogen)	4 μl
Enz. T4 DNA ligase (Gibco BRL, invitrogen)	1,5 μl
H ₂ O mQ stérile	0,5 μl
2. Laisser la nuit à 16 °C

4.2.3. Ligation entre la matrice pC89 et les fragments PCR restreints et purifiés des mutants Alanine I^8 , V^{13}

♦ Ligation de fragments possédant des extrémités protrudantes :

- Taille des fragments restreint en *Bam*HI et *Xba*I à liquer:
 - Insert: 180 pb
 - Matrice: 3350 pb
- Calcul du volume des réactifs :
 - Pour une ligation avec 33,2 ng de matrice on a besoin de:
 - $33,2 \times 5/1 \times 180/3350 = 8,91$ ng d'insert

♦ Protocole :

1. Mélanger :

Produit de PCR (5 ng/μl)	6 μl
pC89 restreint <i>Xba</i> I et <i>Bam</i> HI (8,33 ng/μl)	4 μl
Tampon de réaction (5X) (Gibco BRL, invitrogen)	4 μl
Enz. T4 DNA ligase (Gibco BRL, invitrogen)	1,5 μl
H ₂ O mQ stérile	4,5 μl
2. Laisser la nuit à 16 °C

4.2.4. Ligation de la matrice pC89 et fragments de PCR restreints et purifiés pour chacune des séquences codant les mutants pour Alanine W⁹, C¹⁰, D¹¹, T¹², Y¹⁴

♦ Ligation de fragments possédant des extrémités protrudantes:

- Taille des fragments à lier:
Insert : 180 pb
Matrice : 3350 pb
- Calcul du volume des réactifs :
Pour une ligation avec 33,2 ng de matrice on a besoin de:
 $33,2 \times 5/1 \times 180/3350 = 8,91$ ng d'insert

♦ Protocole

1. Mélanger :

Produit de PCR (2 ng/μl)	12 μl
pC89 restreint <i>Bam</i> HI et <i>Xba</i> I (8,33 ng/μl)	4 μl
Tampon de réaction (5X) (Gibco BRL, invitrogen)	4 μl
Enz. T4 DNA ligase (Gibco BRL, invitrogen)	1,5 μl
H ₂ O mQ stérile	2,5 μl
2. Laisser la nuit à 16 °C

5. Technique de preparation de l'ADN

5.1. Maxipreparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet de purifier les plasmides portés par *E. coli*. Elle permet donc d'isoler l'ADN plasmidique de l'ADN génomique et des protéines bactériennes.

♦ Réactifs : Le kit Nucleobond AX 100 a été utilisé (Macherey-Nagel, Germany)

- Tampon S1 : (Stocké à 4 °C)
 - 50mM Tris-HCl
 - 10mM EDTA
 - RNase A 100 μg
- Tampon S2 : (Stocké à température ambiante)
 - 200 mM NaOH
 - SDS 1%
- Tampon S3 : -2,80mM KAc (acétate de potassium) pH 5.1
- Tampon N2 : (Stocké à température ambiante)
 - 100 mM Tris-HCl
 - 900 mM KCl
 - 15% éthanol
 - ajuster le pH à 6.3 avec de l'H₃PO₄
 - 0,15 Triton X-100

- Tampon N3 : (Stocké à température ambiante)
 - 100 mM Tris-HCl
 - 1150 mM KCl
 - 15% éthanol
 - ajuster le pH à 6.3 avec de l' H_3PO_4
- Tampon N5 : (Stocké à température ambiante)
 - 100 mM Tris-HCl
 - 1000 mM KCl
 - 15% éthanol
 - ajuster le pH à 8.5 avec de l' H_3PO_4

♦ Protocole :

1. Culture des bactéries transformées
 - a) Ensemencer 150 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
 - b) Incuber la culture liquide toute une nuit à 37°C sous forte agitation (250-300 rpm).
 - c) Centrifuger 100 ml de la culture à 4 °C à 3000-5000 rpm durant 5 à 10 minutes dans deux tubes Falcon.
2. Lyse de bactéries et resuspension de l'ADN
 - a) Resuspendre **doucement**, le culot de bactéries dans 4 ml de S1+ RNaseA (stocké à 4°C)
 - b) Ajouter 4 ml de Tampon S2 et mélanger **doucement** sans utiliser de pipette.
 - c) Incuber 5 minutes à température ambiante.
3. Précipitation de l'ADN chromosomique. Ajouter 4 ml de S3 et remuer trois à quatre fois, incubé 5 minutes sur glace.
4. Clarification de la lyse bactérienne par filtration : Utiliser un filtre humidifié par de l'eau stérile.
5. Adsorption sur la cartouche. Charger la cartouche équilibrée (avec 5 ml de tampon N2) avec le filtrat.
6. Laver deux fois la cartouche avec 5 ml de N3
7. Eluer les plasmides avec 5 ml de N5
8. Précipiter l'ADN plasmidique
 - a) Ajouter 0.7 volume d'isopropanol.
 - b) Centrifuger à 4 °C et 14000 rpm (rotor SS34, Sorvall) durant 30 minutes.
 - c) Eliminer le surnageant.
 - d) Laver l'ADN avec 3,6 ml d'éthanol 70% (conservé à 4°C) et centrifuger à 4°C et 14000 rpm durant 5 minutes.
 - e) Eliminer le surnageant
 - f) Eliminer l'éthanol par séchage à proximité de la flamme pendant quelques minutes.
9. Résuspendre dans 20 à 50 µl d' H_2O distillée stérile
10. Stocker à -20°C.

6. Preparation de phages

6.1. Preparation des phages pC89/2C8 (11) (Système phagemide).

♦ Protocole :

1. Préculture : Une préculture (5ml LB, ampicilline 100 µg/ml, streptomycine 30 µg/ml) est ensemencée à partir d'une colonie de DH11S transformée par pC89/2C8 (11). Après une nuit de croissance, la densité optique à 600 nm de la préculture est mesurée.
2. Culture : La préculture est utilisée pour ensemencer une culture de 80 ml (LB, ampicilline 100 µg/ml, streptomycine 30 µg/ml) telle que sa DO (densité optique) initiale à 595 nm soit de 0,05. La culture se fait dans un Erlenmeyer à contre-pales.
3. Lorsque la DO à 595 nm est entre 0.2 et 0.3 la culture est stoppée durant 15 minutes (reconstitution des pili indispensables à la surinfection) puis surinfectée par du phage helper M13K07 à raison de 20 phages par bactérie (On estime que le nombre de bactérie à une DO à 595nm de 1 est de 3×10^8 bactéries/ml)
4. Agiter la culture **lentement** à 37 °C pendant 15 minutes
5. Ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1mM.
6. Agiter vigoureusement à 37°C pendant 5 heures.
7. Préparation des phages à partir du surnageant de culture :
 - a) Centrifuger la culture à température ambiante à 4500 rpm durant 30 minutes.
 - b) Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000-NaCl³ (stérile et stocké à 4°C) et mélanger. Laisser à 4°C durant minimum 5 heures.
 - c) Centrifuger à 4°C et 4500 rpm pendant 30 minutes.
 - d) Résuspendre le culot avec 3 ml de solution de TBS⁴ (1X), PEG 6000-NaCl (0,15 volume).
 - e) Centrifuger à 4°C et 14000 rpm, pendant 20 minutes.
 - f) Resuspendre le culot avec 3 ml de TBS-Azide 0,02 % stérilisé par filtration (MILLEX^R-GP, 0,22 µm, MILLIPORE).
 - g) Centrifuger à température ambiante à 10000 rpm, durant 10 minutes. Récupérer le surnageant.
 - h) Ajouter au surnageant 0,15 volume de Peg 6000-NaCl (stocké à 4°C) et laisser à 4°C durant 1 heure.
 - i) Centrifuger à 4°C et 14000 rpm durant 30 minutes.
 - j) Résuspendre le culot avec 200 µl de TBS-azide 0.02 %.
 - k) Incuber à 65 °C durant 20 minutes. Puis, centrifuger à 10000 rpm durant 10 minutes. Récupérer le surnageant qui constitue la préparation de phages.

³ Composition du stock PEG 6000-NaCl : 100 g PEG (PolyEthylène Glycol) 600 ; 116 g NaCl et 475 ml H₂O mQ. Stériliser le mélange dans l'autoclave, mélanger régulièrement le mélange après autoclave, lors du refroidissement.

⁴ Composition du TBS : Tris 50 mM et NaCl 150 mM, pH 7.5

6.2. Preparation de phages F88-4 exprimant 2C8 (11) à partir de cellules K91KAN (Système phage)

1. Infection de K91Kan avec le phage F88-4/2C8 (11) :

- 5 ml de milieu Terrific Broth⁵ sontensemencés à partir d'une colonie de K91Kan⁶.
- Après 4 à 5 heures d'incubation à 37° sous agitation forte, lorsque la DO à 595nm de cette culture est entre 1,25 et 2,5 stopper l'agitation durant minimum 15 minutes (max. une heure).
- Infecter 10 µl de culture de K91Kan avec 10 µl des différentes dilutions de phages (habituellement 10, 100 et 1000 phages) et laisser à température ambiante durant 10 minutes.
- Ajouter 100 µl de milieu liquide (LB) contenant de la tétracycline (0.2 µg/ml) et incubé à 37°C durant 30 minutes.
- Etaler le mélange sur boîte de Petri contenant du milieu solide LB-agar sélectif (kanamycine -50 µg/ml- et de la tétracycline-20 µg/ml-). Incuber à 37 °C pendant une nuit.

2. Culture et préparation de phage.

- Préculture : Une préculture (5 ml LB, kanamycine 50µg/ml, tétracycline 20µg/ml) est ensemencée à partir d'une colonie de K91Kan infectée par F88-4/2C8 (11). Après une nuit de croissance, la densité optique à 600nm de la préculture est mesurée.
- Culture : La préculture est utilisée pour ensemencer une culture de 80 ml (LB, kanamycine 50 µg/ml, tétracycline 20 µg/ml) telle que sa DO initiale à 595 nm soit de 0,05. La culture se fait dans un Erlenmeyer à contre pale. Agiter à 37 °C, jusqu'à une DO à 595 nm de 1,5-2,5.
- Préparation de phage.
 - Centrifuger la culture à température ambiante à 4500 rpm durant 30 minutes.
 - Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000-NaCl⁷ (stérile et stocké à 4°C) et mélanger. Laisser à 4°C durant minimum 5 heures.
 - Centrifuger à 4°C et 4500 rpm pendant 30 minutes.
 - Resuspendre le culot avec 3 ml de solution de TBS⁸ (1X), PEG 6000-NaCl (0,15 volumes).
 - Centrifuger à 4°C et 14000 rpm, pendant 20 minutes.
 - Resuspendre le culot avec 3 ml de TBS-Azide 0,02 % stérilisé par filtration (MILLEX^R-GP, 0,22 µm, MILLIPORE).
 - Centrifuger à température ambiante à 10000 rpm, durant 10 minutes. Récupérer le surnageant.

⁵ Composition du milieu Terrific Broth (pour 1l) :

900 ml d' H₂O pure ; 12g/l tryptone ; 24 g/l d'extrait de levure ; 4 ml de glycérol, après autoclaver et ajouter 100 ml de tampon phosphate de potassium , autoclavé séparément.

⁶ Génotype des cellules K91KAN : HfrC T2R RelA pit-10 SpoT1 tonA22 ompF627 phoA4 lambda LacZ :: KanR

⁷ Composition du stock PEG 6000-NaCl : 100 g PEG (PolyEthylène Glycol) 600 ; 116 g NaCl et 475 ml H₂O mQ. Stériliser le mélange dans l'autoclave, mélanger régulièrement le mélange après autoclave, lors du refroidissement.

⁸ Composition du TBS : Tris 50 mM et NaCl 150 mM, pH 7.5

- c.8) Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000-NaCl (stocké à 4°C) et laisser à 4°C durant 5 heures.
- c.9) Centrifuger à 4°C et 14000 rpm durant 30 minutes.
- c.10) Resuspendre le culot avec 200 µl de TBS-azide 0,02 %.
- c.11) Incuber à 65 °C durant 20 minutes. Puis, centrifuger à 10000 rpm durant 10 minutes. Récupérer le surnageant qui constitue la préparation de phages.

6.3. Determination du nombre de Colony Forming Units (PFU) pour les preparations de phages F88-4//2C8 (11) et pC89/2C8 (11)

Pour estimer le nombre de phages dans une préparation, on infecte des bactéries avec différentes dilutions de la préparation de phages, et on calcule le nombre de phages capables d'infecter ces cellules/ ml (CFU/ml).

♦ Protocole

1. Infection de K91Kan ou DH11S avec respectivement les phages F88-4/2C8(11) et pC89/2C8 (11):
 - a) 5 ml de milieu Terrific Broth sontensemencés à partir d'une colonie isolée de K91 Kan ou DH11S.
 - b) Après 4 à 5 heures d'incubation à 37° sous agitation forte, lorsque la DO à 595nm de cette culture est entre 1,25 et 2,5 stopper l'agitation durant minimum 15 minutes (Max. une heure).
 - c) Infecter 10µl de cellules K91Kan ou DH11S avec 10µl des différentes dilutions de phages (habituellement 10, 100 et 1000 fois) et laisser à température ambiante durant 10 minutes.
2. Ajouter 100 µl de milieu liquide (LB) contenant soit de la tétracycline (0,2 µg/ml) pour K91Kan soit sans antibiotique pour DH11S et incuber à 37°C durant 30 minutes.
3. Etaler le mélange sur boîte de Petri contenant du milieu solide LB-agar sélectif (soit kanamycine 50 µg/ml et tétracycline 20 µg/ml pour K91Kan soit ampicilline 100µg/ml, streptomycine 30 mg/ml pour DH11S). Incuber à 37 °C pendant une nuit.

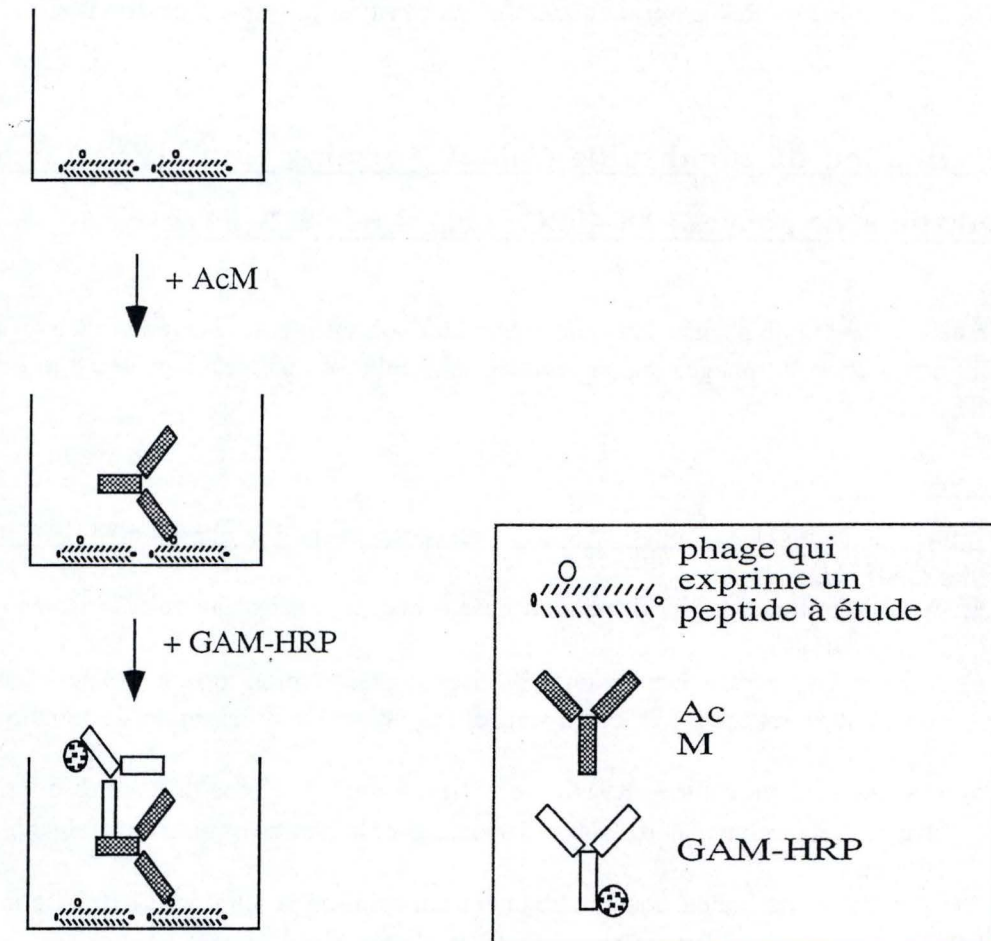


Figure 41- **ELISA indirect.**

Les plaques multipuits sont d'abord sensibilisées avec du phage (ou du LPS) puis incubé avec l'AcM. La présence de l'AcM est révélée grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (GAM-HRP).

7. Techniques basés sur la reconnaissance antigène-anticorps.

7.1. Enzyme Linked Immuno Essay Absorbed (ELISA) : Etude de la reconnaissance entre le peptide 2C8 (11) présenté sur différents types de phages et l'AcM 2C8

Cette technique permet de mesurer l'intensité de la reconnaissance entre le mimotope présenté sur phage, adsorbé au fond d'un puits et l'AcM.

Les différentes dilutions de phages sont adsorbées sur une surface possédant une affinité aspécifique pour les protéines. Les phages sont ensuite incubés avec l'AcM d'intérêt puis avec un polyclonal anti-AcM conjugué à la peroxydase. Une réaction enzymatique avec un chromogène catalysée par la peroxydase permet finalement de visualiser la liaison du conjugué, et donc la présence de l'AcM d'intérêt. (Figure 41)

♦ Protocole :

1. Adsorption des phages :
 - a) Un volume de 100 µl contenant les différentes dilutions de préparations de phages à tester sont déposées dans les puits d'une sur plaque MaxisorpTM surface (NUNC-ImmunoTM Plate, Brand Products).
 - b) Incuber à 37°C durant 2 heures ou une nuit à 4°C
 - c) Eliminer le contenu liquide des puits
2. Saturation :
 - a) Ajouter 300 µl de TBS additionné de lait écrémé en poudre (Gloria) 5 %
 - b) Incubation à 37 °C durant 2 heures.
 - c) Eliminer le contenu liquide des puits
3. Incubation avec l'anticorps :
 - a) Ajouter un volume de 100 µl par puits de solution de l'anticorps monoclonal primaire, soit l'AcM 2C8 (5 µg/ml) , soit l'AcM anti-pVIII (dilué 10000 fois), dans une solution de TBS-lait 1 %.
 - b) Incuber à 37 °C durant 1 heure.
 - c) Eliminer le contenu liquide des puits
4. Lavages :
 - a) Déposer dans chaque puits un volume de 300 µl d'une solution de TBS (1X) et de Tween 0.05 %.
 - b) Jeter le contenu liquide des puits et répéter le lavage encore quatre fois.
5. Incubation avec l'anticorps secondaire :
 - a) Ajouter un volume de 100 µl par puits de solution du polyclonal de chèvre anti-- Ac de souris couplé à la peroxydase (Dako, Denmark) dans une solution de TBS-lait 1 %.
 - b) Incuber à 37 °C durant 1 heure.
 - c) Eliminer le contenu liquide des puits
6. Lavages : Répéter l'étape 4.
7. Révélation :

- a) Ajouter 100µl de K-blue (Neogen) et incubé à température ambiante durant 15 minutes à l'obscurité.
- b) Ajouter du H₂SO₄ 2N, 25 µl par puits, et laisser durant 10 minutes
- c) Mesurer la DO sur lecteur de plaques (EL-340, Bio-Tek Instruments) à 450-630 nm.

7.2. Dot Blot

Le dot blot est une technique qui consiste en l'analyse qualitative de l'interaction entre un anticorps et un antigène adsorbé sur une membrane de nitrocellulose. Cette technique permet d'analyser de nombreux échantillon en parallèle.

Dans notre cas, l'objectif est d'évaluer la reconnaissance entre l'anticorps monoclonal 2C8 et les peptides mutants de l'alanine scanning préparés à partir de surnageant de phage.

♦ Protocole :

1. Préparation des surnageants de phage.

- a) Repiquer dans un format 96 puits les différents clones recombinants sur une boîte de Petri, contenant du milieu solide LB, de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la streptomycine (30 µg/ml).
- b) Laisser à 37 °C durant une nuit.
- c) Préculture: 400 µl de milieu liquide LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la streptomycine (30 µg/ml) sontensemencés avec les colonies du repiquage et incubé à 37 °C durant une nuit.
- d) Culture: La préculture est utilisée pour ensemenecer une culture de 700 µl, contenant du LB avec de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la streptomycine (30 µg/ml), pour que la DO initiale à 595 nm de la culture soit de 0.05. Incuber à 37°C en agitant jusqu'à la DO à 595 nm soit entre 0,25 et 0,4 (phase exponentielle). Cette culture est faite dans un support multipuits Falcon.
- e) La culture est alors laissé à 37 °C durant 15 minutes (reconstitution des pili indispensables à la surinfection)
- f) Surinfection avec le phage helper M13K07 :
 - f.1) Ajouter une quantité de phage helper M13K07 égale à 20 CFU/bactérie.
 - f.2) Agiter **lentement** la culture à 37 °C pendant 15 minutes.
 - f.3) Ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1mM.
- g) Agitation de la culture à 37 °C durant une nuit.
- h) Centrifuger à 4°C et à 1500 rpm, durant 30 minutes.
- i) Récupérer le surnageant de phages et ajouter 150 µl d'une solution contenant de TBS(1X) et de l'azide 0,05 %.
- j) Garder à 4°C.

2. Dot Blot :

- a) Couper la membrane de nitrocellulose (Hybond C 0,45 Micron, Amershan), à mesure du nombre de puits à tester. Deux membranes sont utilisés en parallèle; l'une pour utilisée avec l'AcM 2C8 et l'autre avec l'AcM anti-pVIII.
- b) Aspirer 100 µl de surnageant de phages au travers de la membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil à transfert (Dot Blot TM apparatus, Bio Rad).
- c) Saturation :

- c.1) Ajouter sur la membrane 30 ml d'une solution contenant du TBS (1X), et du lait écrémé en poudre (Gloria) 5 %.
- c.2) Incuber à température ambiante, en agitation durant 2 heures.
- c.3) Eliminer la solution de saturation.
- d) Incubation avec l'anticorps :
 - d.1) Déposer sur la membrane 30 ml d'une solution de contenant l'AcM soit 2C8 (10 µg/ml) ou l'AcM anti-pVIII (dilué 10000 fois) dans du TBS 1X contenant 1% de lait en poudre (Gloria). Agiter durant 1 heure à température ambiante.
 - d.2) Eliminer la solution.
- e) Lavages :
 - e.1) Incuber la membrane avec 30 ml d'une solution de TBS (1X) Tween 0,05 % (w/v) durant 5 minutes.
 - e.2) Jeter la solution de lavage et répéter le lavage encore 4 fois
- f) Incubation avec l'anticorps secondaire :
 - f.1) déposer sur la membrane 30 ml d'une solution de contenant l'Ac secondaire polyclonal de chèvre anti-Ac de souris couplé à la peroxydase (Dako, Denmark) (dilué 2000 fois), dans du TBS 1X contenant 1% de lait écrémé en poudre (Gloria). Agiter durant 1 heure à température ambiante.
 - f.2) Eliminer la solution d'incubation.
- g) Lavages : Répéter les lavages de l'étape e).
- h) Révélation (Kit Révélation chémoluminescence, Amershan Pharmacia).
 - h.1) incuber avec 0,125 ml/cm² de membrane des réactifs du kit de détection
 - h.2) Incuber la membrane avec la solution de révélation à température ambiante durant 1 minute.
 - h.3) Révéler le dot blot, par application d'un film photographique (X-Ray Film, FujiMedical) avec un temps d'exposition de 30 secondes à 5 minutes.
 - h.4) Révéler le film photographique (Révélateur, Fixateur) le laver à l'eau claire et sécher le film.

8. Technique de transformation de bactéries

8.1. Informations générales

La technique de transformation de cellules bactériennes consiste dans ce cas à introduire les différents phagemides sous leur forme double brin circulaire. Une fois dans la cellule le phagemide pourra se répliquer et exprimer les PVIII recombinantes avec nos différents mutants. C'est la méthode de transformation de cellules "CaCl₂ compétentes" par choc thermique qui a été utilisée pour toutes nos constructions.

8.2. Préparation de cellules compétentes DH11S

Rendre des cellules compétentes signifie les mettre dans un état tel que la transformation par de l'ADN exogène sera facilitée. La méthode utilisée consiste à suspendre les cellules bactériennes dans

une solution hypotonique de CaCl_2 ce qui induit une déstabilisation de leur paroi, et un gonflement (production de sphéroplastes).

♦ Protocole

1. Une colonie de cellules DH11S⁹ cultivées sur du milieu solide LB additionné de streptomycine 30 $\mu\text{g/ml}$ est prélevée pour ensemer 5 ml de milieu liquide LB/streptomycine (30 $\mu\text{g/ml}$).
2. Lorsque la préculture est à une DO à 595nm entre 0,3-0,5 (culture en phase exponentielle) on en prélève 3 ml pour ensemer 300 ml de milieu LB/streptomycine (30 $\mu\text{g/ml}$) dans un erlenmeyer avec de contre-pales.
3. Lorsque la culture arrive à une DO à 595 nm de 0.3 (croissance exponentielle), la culture est arrêtée et laissée durant 10 minutes sur de la glace.
4. Centrifuger à 4°C et 4000 rpm pendant 5 minutes.
5. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50mM (à 4°C) équivalente à la quantité du volume de culture initial.
6. Répéter de nouveau les étapes 3 et 4 de ce protocole.
7. Laisser 10 minutes sur glace.
8. Centrifuger à 4°C et 4000 rpm pendant 5 minutes.
9. Resuspendre le culot dans un volume final de 15 ml de CaCl_2 50 mM (à 4°C) avec 15 % de glycérol (stockée à 4°C)
10. Aliquoter et stocker à -80°C.

8.3. Transformation des cellules DH11S " CaCl_2 compétentes" avec les produits de ligation de nos différentes constructions

8.3.1. Constructions pC89/2C8 (11), pC89/CONSENSUS ETENDU et pC89/CONSENSUS STRICT

♦ Protocole :

1. Mélanger doucement 150 μl de cellules DH11S¹⁰ " CaCl_2 compétentes" avec 8 μl (soit 38 ng) des différents produits de ligation et incubé pendant 1 heure sur glace.
2. Faire le choc thermique à 42°C pendant 2 minutes
3. Ajouter 1 ml de milieu liquide LB et laisser à 37°C pendant 30 minutes.
4. Etaler sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide additionné d'ampicilline 100 $\mu\text{g/ml}$, de streptomycine 30 $\mu\text{g/ml}$, d'IPTG (1mM) et de 0.003 % d'X-Gal.
5. Incuber à 37°C pendant une nuit.

⁹ Génotype des cellules DH11STM : F', *mcr* A, Δ (*mrr hsd* RMS *mcr* BC), Δ (*lac-pro* AB), Δ (*recA* 1398), *deo* R, *rps* L, *srl*, *thi*, F' *pro* AB+, *lac* I^q Z Δ M15.

¹⁰ Génotype des cellules DH11STM : F', *mcr* A, Δ (*mrr hsd* RMS *mcr* BC), Δ (*lac-pro* AB), Δ (*recA* 1398), *deo* R, *rps* L, *srl*, *thi*, F' *pro* AB+, *lac* I^q Z Δ M15.

8.3.2. Construction des mutants de l'alanine scanning T^1 à V^{14}

♦ Protocole :

1. Mélanger **douxment** 300 μ l de cellules "CaCl₂ compétentes" (la compétence pour 200 μ l de cellules était $2,4 \times 10^5/\mu$ g plasmide pUC18) avec 20 μ l de produit de ligation et incubé pendant 1 heure sur glace.
2. Faire le choc thermique à 42°C pendant 2 minutes.
3. Ajouter 1 ml de milieu liquide LB et laisser à 37°C pendant 30 minutes.
4. Etaler sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide additionné d'ampicilline 100 μ g/ml, de streptomycine 30 μ g/ml, d'IPTG (1mM) et X-Gal 0.003 % (w/v).
5. Incuber à 37°C pendant une nuit.

8.4. Transformation de la souche XL1 BLUE "CaCl₂ compétentes" par le phagémide pC89

Le phagémide pC89 a été transformé des cellules XL1 Bue¹¹. Cette souche transformée servira de contrôle dans les dot blot et permettra de préparer une minipréparation du phagémide.

♦ Protocole :

1. Mélanger **douxment** 200 μ l de cellules "CaCl₂ compétentes" avec 1 μ l de miniprep de pC89 (soit 2.3 ng), et incubé pendant 1 heure sur glace.
2. Faire le choc thermique à 42°C pendant 2 minutes.
3. Ajouter 1 ml de milieu liquide LB et laisser à 37°C pendant 30 minutes.
4. Etaler sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB solide additionné d'ampicilline 100 μ g/ml, de streptomycine 30 μ g/ml, d'IPTG (1mM) et X-Gal 0.003 % (w/v).
5. Incuber à 37°C pendant une nuit.

9. Divers

9.1. Antibiotiques

- ♦ Ampicilline : 100 μ g/ml (dans l'eau mQ stérile)
- ♦ Streptomycine : 30 μ g/ml (dans l'eau mQ stérile)
- ♦ Kanamycine : 50 μ g/ml (dans l'eau mQ stérile)
- ♦ Tétracycline : 20 μ g/ml (dans Ethanol 70 %)

¹¹ Génotype des cellules XL1-Blue (S) : F', Tn10 *proA*⁺B⁺, *lacI*^q, Δ (*lac Z*)M15, *recA*1, *end A*1, *gyr A*96 (NaI^r), *thi*, *hsd R*17 (rk⁻mk⁺), *sup E*44, *rel A*1 *lac*

9.2. Autres

- ♦ XGal : 3 % (w/v) (dans du diméthylformamide-DMF-)

BIBLIOGRAPHIE

Ahvonen, P., Jansson, E. & Aho, K. (1969). Marked cross-agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol Microbiol Scand* **75**, 291-5.

Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2002). *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun* **70**, 1915-23.

Alton, G. G., Jones, L. M. & Pietz, D. E. (1975). Laboratory techniques in brucellosis. *Monogr Ser World Health Organ* **55**, 1-163.

Andreoni, J., Kayhty, H. & Densen, P. (1993). Vaccination and the role of capsular polysaccharide antibody in prevention of recurrent meningococcal disease in late complement component-deficient individuals. *J Infect Dis* **168**, 227-31.

Arnon, R., Tarrab-Hazdai, R. & Steward, M. (2000). A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology* **101**, 555-62.

Baek, H., Suk, K. H., Kim, Y. H. & Cha, S. (2002). An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res* **30**, e18.

Betts, M., Beining, P., Brunswick, M., Inman, J., Angus, R. D., Hoffman, T. & Golding, B. (1993). Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infect Immun* **61**, 1722-9.

Bianchi, E., Folgori, A., Wallace, A., Nicotra, M., Acali, S., Phalipon, A., Barbato, G., Bazzo, R., Cortese, R., Felici, F. & et al. (1995). A conformationally homogeneous combinatorial peptide library. *J Mol Biol* **247**, 154-60.

Bowden, R. A., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S., Bernard, S. & Dubray, G. (1995). Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* **63**, 3945-52.

Brandenburg, K. & Seydel, U. (1998). Infrared spectroscopy of glycolipids. *Chem Phys Lipids* **96**, 23-40.

Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A., Meikle, P. J., Perry, M. B. & Peters, T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* **57**, 2829-36.

Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W. & Perry, M. B. (1987). Structural elucidation of the *Brucella melitensis* M antigen by high-resolution NMR at 500 MHz. *Biochemistry* **26**, 8717-26.

Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W. & Perry, M. B. (1987). The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M antigen) and polysaccharide B produced by *Brucella melitensis* 16M. *FEBS Lett* **216**, 261-4.

Bundle, D. R., Gidney, M. A., Perry, M. B., Duncan, J. R. & Cherwonogrodzky, J. W. (1984). Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infect Immun* **46**, 389-93.

Caroff, M., Bundle, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. & Duncan, J. R. (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect Immun* **46**, 384-8.

Charalambous, B. M. & Feavers, I. M. (2000). Peptide mimics elicit antibody responses against the outer-membrane lipooligosaccharide of group B *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* **191**, 45-50.

Cloeckaert, A., Jacques, I., Bowden, R. A., Dubray, G. & Limet, J. N. (1993). Monoclonal antibodies to *Brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B. abortus*. *Res Microbiol* **144**, 475-84.

Cloeckaert, A., Jacques, I., de Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. N. (1992). Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides. *Infect Immun* **60**, 312-5.

Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G. & Limet, J. N. (1993). Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* **139**, 1551-6.

Cunningham, B. C. & Wells, J. A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine- scanning mutagenesis. *Science* **244**, 1081-5.

De Bolle, X., Laurent, T., Tibor, A., Godfroid, F., Weynants, V., Letesson, J. J. & Mertens, P. (1999). Antigenic properties of peptidic mimics for epitopes of the lipopolysaccharide from *Brucella*. *J Mol Biol* **294**, 181-91.

de la Cruz, V. F., Lal, A. A. & McCutchan, T. F. (1988). Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* **263**, 4318-22.

DeGraaf, M. E., Miceli, R. M., Mott, J. E. & Fischer, H. D. (1993). Biochemical diversity in a phage display library of random decapeptides. *Gene* **128**, 13-7.

di Marzo Veronese, F., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E. & Perham, R. N. (1994). Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J Mol Biol* **243**, 167-72.

Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. & Cesareni, G. (1991). Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol* **222**, 301-10.

Fernandez-Lago, L. & Diaz, R. (1986). Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **24**, 76-80.

Fernandez-Lago, L., Moriyon, I., Toyos, J. & Diaz, R. (1982). Immunological identity of brucella native hapten, polysaccharide B, and *Yersinia enterocolitica* serotype 9 native hapten. *Infect Immun* **38**, 778-80.

Fersht, A. R. & Winter, G. P. (1985). Redesigning enzymes by site-directed mutagenesis. *Ciba Found Symp* **111**, 204-18.

Fields, B. A., Goldbaum, F. A., Ysern, X., Poljak, R. J. & Mariuzza, R. A. (1995). Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature* **374**, 739-42.

Fleuridor, R., Lees, A. & Pirofski, L. (2001). A cryptococcal capsular polysaccharide mimotope prolongs the survival of mice with *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **166**, 1087-96.

Forestier, C., Moreno, E., Meresse, S., Phalipon, A., Olive, D., Sansonetti, P. & Gorvel, J. P. (1999). Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect Immun* **67**, 4048-54.

Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A. A. & Moreno, E. (1995). Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* **146**, 569-78.

Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckert, A., Godfroid, J. & Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* **66**, 5485-93.

Goldblatt, D., Levinsky, R. J. & Turner, M. W. (1992). Role of cell wall polysaccharide in the assessment of IgG antibodies to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in childhood. *J Infect Dis* **166**, 632-4.

Greenspan , N. S. (1992) Epitopes, paratopes and other topes: do immunologists know what they are talking about? *Bulletin Inst. Pasteur* **90**, 267-279.

Harris, S. L., Craig, L., Mehroke, J. S., Rashed, M., Zwick, M. B., Kenar, K., Toone, E. J., Greenspan, N., Auzanneau, F. I., Marino-Albernas, J. R., Pinto, B. M. & Scott, J. K. (1997). Exploring the basis of peptide-carbohydrate crossreactivity: evidence for discrimination by peptides between closely related anti-carbohydrate antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2454-9.

Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T. & Pastan, I. (1993). Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* **128**, 43-9.

Kay , B. K., Hoess , R. H. (1996). Principles and applications of phage display *Phage display of peptides and proteins . A laboratory manual* 21-34

Kittelberger, R., Bundesen, P. G., Cloeckaert, A., Greiser-Wilke, I. & Letesson, J. J. (1998). Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet Microbiol* **60**, 45-57.

Kohler, H., Kaveri, S., Kieber-Emmons, T., Morrow, W. J., Muller, S. & Raychaudhuri, S. (1989). Idiotypic networks and nature of molecular mimicry: an overview. *Methods Enzymol* **178**, 3-35.

Lang, S., Xu, J., Stuart, F., Thomas, R. M., Vrijbloed, J. W. & Robinson, J. A. (2000). Analysis of antibody A6 binding to the extracellular interferon gamma receptor alpha-chain by alanine-scanning mutagenesis and random mutagenesis with phage display. *Biochemistry* **39**, 15674-85.

Limet, J. N., Bosseray, N., Garin-Bastuji, B., Dubray, G. & Plommet, M. (1989). Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*. *J Med Microbiol* **30**, 37-43.

Loughlin, A. M., Marchant, C. D., Lett, S. & Shapiro, E. D. (1992). Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b vaccines in Massachusetts children 18 to 59 months of age. *Pediatr Infect Dis J* **11**, 374-9.

Lu, M., Stoller, M. O., Wang, S., Liu, J., Fagan, M. B. & Nunberg, J. H. (2001). Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J Virol* **75**, 11146-56.

Luo, P., Agadjanyan, M., Qiu, J., Westerink, M. A., Steplewski, Z. & Kieber-Emmons, T. (1998). Antigenic and immunological mimicry of peptide mimotopes of Lewis carbohydrate antigens. *Mol Immunol* **35**, 865-79.

Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A. & Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* **128**, 51-7.

Martin, F., Toniatti, C., Salvati, A. L., Venturini, S., Ciliberto, G., Cortese, R. & Sollazzo, M. (1994). The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *Embo J* **13**, 5303-9.

Martinez-Alonso, C., Coutinho, A. & Augustin, A. A. (1980). Immunoglobulin C-gene expression. I. The commitment to IgG subclass of secretory cells is determined by the quality of the nonspecific stimuli. *Eur J Immunol* **10**, 698-702.

Meikle, P. J., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. & Bundle, D. R. (1989). Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect Immun* **57**, 2820-8.

Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. & Galfre, G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* **154**, 3162-72.

Mertens, P., Walgraffe, D., Laurent, T., Deschrevel, N., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2001). Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Brucella*. *Int Rev Immunol* **20**, 181-99.

Monafo, W. J., Greenspan, N. S., Cebra-Thomas, J. A. & Davie, J. M. (1987). Modulation of the murine immune response to streptococcal group A carbohydrate by immunization with monoclonal anti-idiotope. *J Immunol* **139**, 2702-7.

Montaraz, J. A., Winter, A. J., Hunter, D. M., Sowa, B. A., Wu, A. M. & Adams, L. G. (1986). Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* **51**, 961-3.

Monzavi-Karbassi, B., Cunto-Amesty, G., Luo, P. & Kieber-Emmons, T. (2002). Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. *Trends Biotechnol* **20**, 207-14.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**, 3569-76.

Moriyon, I. & Lopez-Goni, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* **1**, 19-26.

Morrison, K. L. & Weiss, G. A. (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 302-7.

Oomen, R. P., Young, N. M. & Bundle, D. R. (1991). Molecular modeling of antibody-antigen complexes between the *Brucella abortus* O-chain polysaccharide and a specific monoclonal antibody. *Protein Eng* **4**, 427-33.

Palmer, D. A. & Douglas, J. T. (1989). Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **27**, 2331-7.

Parhami-Seren, B., Viswanathan, M., Strong, R. K. & Margolies, M. N. (2001). Structural analysis of mutants of high-affinity and low-affinity p-azophenylarsonate-specific antibodies generated by alanine scanning of heavy chain complementarity-determining region 2. *J Immunol* **167**, 5129-35.

Phalipon, A., Folgori, A., Arondel, J., Sgaramella, G., Fortugno, P., Cortese, R., Sansonetti, P. J. & Felici, F. (1997). Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Eur J Immunol* **27**, 2620-5.

Qureshi, N., Takayama, K., Seydel, U., Wang, R., Cotter, R. J., Agrawal, P. K., Bush, C. A., Kurtz, R., Berman, D. T. (1994). Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. *J. Endotox Res* **1**, 137-148.

Rose, D. R., Przybylska, M., To, R. J., Kayden, C. S., Oomen, R. P., Vorberg, E., Young, N. M. & Bundle, D. R. (1993). Crystal structure to 2.45 Å resolution of a monoclonal Fab specific for the *Brucella* A cell wall polysaccharide antigen. *Protein Sci* **2**, 1106-13.

Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-90.

Shikhman, A. R., Greenspan, N. S. & Cunningham, M. W. (1994). Cytokeratin peptide SFGSGFGGGY mimics N-acetyl-beta-D-glucosamine in reaction with antibodies and lectins, and induces in vivo anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* **153**, 5593-606.

Shin, J. S., Lin, J. S., Anderson, P. W., Insel, R. A. & Nahm, M. H. (2001). Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and their peptide mimotopes. *Infect Immun* **69**, 3335-42.

Smith, G. P. (1988). Filamentous phages as cloning vectors. *Vectors : A survey of molecular cloning vectors and their uses* R. L. Rodriguez, and D. T. Denhardt, eds. p 61-84.

Steward, M. W., Stanley, C. M. & Obeid, O. E. (1995). A mimotope from a solid-phase peptide library induces a measles virus-neutralizing and protective antibody response. *J Virol* **69**, 7668-73.

Ulevitch, R. J. & Tobias, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**, 19-22.

Valadon, P., Nussbaum, G., Oh, J. & Scharff, M. D. (1998). Aspects of antigen mimicry revealed by immunization with a peptide mimetic of *Cryptococcus neoformans* polysaccharide. *J Immunol* **161**, 1829-36.

Vizcaino, N., Chordi, A. & Fernandez-Lago, L. (1991). Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Res Microbiol* **142**, 971-8.

Wang, B., Dickinson, L. A., Koivunen, E., Ruoslahti, E. & Kohwi-Shigematsu, T. (1995). A novel matrix attachment region DNA binding motif identified using a random phage peptide library. *J Biol Chem* **270**, 23239-42.

Westerink, M. A., Giardina, P. C., Apicella, M. A. & Kieber-Emmons, T. (1995). Peptide mimicry of the *meningococcal* group C capsular polysaccharide.

Westerink, M. A., Giardina, P. C., Campagnari, A. A. & Apicella, M. A. (1990). The thymus-dependent nature of the murine antibody response to a monoclonal anti-idiotypic antibody to the *Neisseria meningitidis* serogroup C capsular polysaccharide. *Microb Pathog* **8**, 411-9.

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Tibor, A., Denoel, P. A., Godfroid, F., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1997). Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **65**, 1939-43.

Weynants, V., Tibor, A., Denoel, P. A., Saegerman, C., Godfroid, J., Thiange, P. & Letesson, J. J. (1996). Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol* **48**, 101-12.

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Tibor, A., Denoel, P. A., Godfroid, F., Limet, J. N., and Letesson, J. J. (1997). Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **65**, 1939-43

White , P. J. (1951) Differentiation of smooth and non smooth colonies of *Brucellae* J. *Bacteriol.* **61**, 239-240.

Wilson , G. (1984) Principles of bacteriology, virology and immunity. *Principles of bacteriology, virology and immunity* **2**, 406-421

Wu, S. C. & Lin, C. W. (2001). Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Virus Res* **76**, 59-69.

Yip, Y. L., Smith, G. & Ward, R. L. (2001). Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. *Immunol Lett* **79**, 197-202.

Young, A. C., Valadon, P., Casadevall, A., Scharff, M. D. & Sacchettini, J. C. (1997). The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes. *J Mol Biol* **274**, 622-34.

Young, N. M., Gidney, M. A., Gudmundsson, B. M., MacKenzie, C. R., To, R., Watson, D. C. & Bundle, D. R. (1999). Molecular basis for the lack of mimicry of *Brucella* polysaccharide antigens by Ab2gamma antibodies. *Mol Immunol* **36**, 339-47.